

525,503

Rec'd PCT/PTO 23 FEB 2005

10/525503

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018615 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12M 3/00, 902 Oita (JP). 堀 隆博 (HORI, Takahiro) [JP/JP]; 〒870-0836 大分県 大分市 上野南陽台西22 Oita (JP).
A61L 27/22, C12N 5/06, 11/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010692 (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2003年8月25日 (25.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) 優先権データ:
特願2002-243923 2002年8月23日 (23.08.2002) JP
特願2002-244294 2002年8月23日 (23.08.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 旭メディカル株式会社 (ASAHI MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8482 東京都千代田区神田美土代町9番地1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 徳島 恭雄 (TOKUSHIMA, Yasuo) [JP/JP]; 〒416-0931 静岡県富士市 夢原1075-3 レオニス307号室 Shizuoka (JP). 北口 暢哉 (KITAGUCHI, Nobuya) [JP/JP]; 〒417-0001 静岡県富士市 今泉3689-25 Shizuoka (JP). 稲留 秀一郎 (INADOME, Shuichiro) [JP/JP]; 〒870-0921 大分県大分市 萩原1-2-1 サンモール南

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FIBRIN-CONTAINING COMPOSITION

(54) 発明の名称: フィブリン含有組成物

(57) Abstract: It is intended to provide a scaffold material having favorable properties and being appropriate for cell proliferation and differentiation in regeneration therapy. Namely, a fibrin-containing biological scaffold material to be used in the case of employing a fibrin composition for the regeneration of a human tissue and cell proliferation, characterized by containing a mixture of a fibrinogen concentrate, which is obtained from human plasma by a quick and rough purification method, with a fibrinogen activator.

(57) 要約: 本発明の課題は、再生医療において細胞増殖・分化を行うのに適した性能のよい足場材の提供することである。本発明によれば、フィブリン組成物を人体組織の再生及び細胞増殖に用いる場合において、ヒト血漿から、短時間・粗精製工程により得られたフィブリノーゲン濃縮物と、フィブリノーゲン活性化物との混合物を含むことを特徴とするフィブリン含有生物学的足場材が提供される。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/018615 A1

明 細 書

フィブリン含有組成物

技術分野

本発明は、組織再生のための生物学的足場材、その製法及び製造システムに関わる。

背景技術

近年、従来から行われてきた臓器移植や人工臓器を用いる治療法にとって代わる方法として、再生医療に大きな期待が寄せられている。再生医療の研究は、骨髄移植のような幹細胞の補充による細胞・組織の再生、創傷治癒、手術時の皮膚、臓器の損傷修復を目指した研究と、狭義の組織工学 (Tissue engineering) という概念で捉えられる一連の研究という2つの方向性で発展してきた。狭義の組織工学とは、細胞が生体内で生着する際に必要な足場 (scaffold) と細胞の両方を用いて修復しようとする研究である。再生医学には「細胞」、「細胞の増殖・分化のための足場」、及び「細胞増殖因子」が必要である。これまで足場となる材料には、生体に害を与えないための生体親和性、新しい生体組織の形成と共に材料が分解/吸収されるための生体吸収性が要求されることから生物学的材料が望まれている。

フィブリン糊は、生理的な血液凝固作用を利用して、組織の接着、閉鎖及びそれに続く創傷治療を行うための外用接着剤であり、現在各種外科手術に広く用いられている。また、フィブリン糊を再生医療分野における生物学的足場材に用いる技術も多数知られている (Cell Transplantation、7、309-317、1998 ; 及び、Burn、24、621-630、1998)。

従来からフィブリン糊は、アレルギー反応やショック等の免疫反応等の副作用を避けるため、自己血漿から調製したクリオプレシピテート (クリオ) を使用することが行われている。自己血漿から調製した自己フィブリン糊は、言うまでもなく組織再生用途以外にも、血液凝固作用を利用した自己組織の接着・閉鎖によ

る止血用途に用いることが可能である。これまで自己血フィブリン糊の製造方法として以下のような方法が知られている。

例えば、Casali らの方法は、長時間冷凍、緩速解凍後、遠心分離を行い、全血からフィブリン糊を調製するのに約 30 時間かかるという方法である (Transmission, 32, 641-643, 1992: 以下、本明細書において本方法を「クリオ法」という)。

その概略を説明すると、まず、全血を採取し、この全血を遠心分離(1,000g×15分、4℃)して血漿成分を分離する。次に、遠心分離により得られた血漿成分を超低温フリーザーに移し、-80℃にて18時間静置して凍結させる、次に凍結状態の血漿成分を約4℃の冷蔵庫に入れて、16時間かけて緩速解凍する。このような凍結及び解凍処理を血漿成分に施すと、血漿成分中にクリオプレシピテート(フィブリノーゲン/第13因子)が析出する。次に冷却遠心機にて1000×gで15分程度の遠心分離を行う(4℃)。解凍後、さらに再び4℃にて1000×gで15分程度の遠心分離を行い、沈澱物を回収し、フィブリノーゲン濃縮物とする。一回目の解凍、遠心後に得た沈澱物を乱さぬように注意しながら、上記条件に従って再度凍結及び解凍を繰り返す場合もある(ダブルクリオ法)。

別の方法として、Kjaergard によるエタノール沈澱法がある (Surg Gynecol Obstet, 175(1), July, 1992: 以下、本明細書において本方法を「エタノール法」という)。この方法は、全血から得られた血漿を氷水上でエタノールを添加してフィブリノーゲンを沈澱させる方法である。

上記のクリオ法又はエタノール法で得られたフィブリノーゲンを用いたフィブリン糊は、再生医療などの生物学的足場材として使用可能であることが報告されている。例えば、エタノール法によって得られたフィブリノーゲンで調製したフィブリンゲル内に繊維芽細胞を包埋して、その上に上皮細胞を播種することにより、人工皮膚を作製する技術(特開平10-277143号公報)、エタノール法によって得られたフィブリノーゲンで調製したフィブリンゲルで生物学的足場材を作製し、その上で角化細胞培養物を作製し、移植用表皮細胞層とする技術、繊

維芽細胞と角化細胞により移植用真皮細胞層とする技術（特許第3134079号公報）等が知られている。また、クリオ法とエタノール法で得られたフィブリノーゲンを用いてフィブリン培養を行い、軟骨細胞の細胞増殖及び代謝能の比較検討を行った結果、クリオ法の方が軟骨細胞の形態維持、細胞増殖、プロテオグリカン蓄積がより支持されるという報告がある（American Journal of Veterinary Research、59、514-520、1998）。

また、上記クリオ法を改良し、短時間冷凍、急速解凍を行い、1～2時間という短時間でフィブリノーゲンを得る方法が知られている（特表2001-513073号公報：以下、本明細書において本方法を「改良クリオ法」という）。同種角膜上皮幹細胞を、血漿を原料として上記の改良クリオ法で作製したフィブリンゲル内で培養し、目の表面組織置換体（角膜置換体）を作製するという報告があるが（Cornea 21(5):505-510、2002）、この論文では、細胞とフィブリン足場材は同一人由来のものではなく、また足場材としての性能を他法と比較したものでもない。

自家フィブリン糊調製のためのフィブリノーゲン製造方法として、有機溶媒による沈殿に続く遠心分離、あるいは8回から10回の凍結解凍の繰り返し操作後に遠心分離を行う装置の開示がある（米国特許第6083383号明細書）。

また、自己フィブリン糊を迅速に調製する方法としてフィブリノーゲン濃縮のために限外ろ過法を用いる方法が提供されている（特表平11-508813号公報）。この方法では、血液画分を濃縮するために「真空源に接続するのに適合した出口、並びに第1及び第2の開口部を有する限外ろ過ユニットと、前記血液画分を前記限外ろ過ユニットに送り出すための流体デリバリーシステムに、前記限外ろ過ユニットの第1の開口部を接続する第1のバルブと、パージ流体デリバリーシステムに、前記限外ろ過ユニットの第2の開口部を接続する第2のバルブと、を含む装置」を用いるものである。

しかし、この方法では、①装置への血漿の導入が閉鎖系にできない、②血漿を採取するための手段が別途必要である、③分画分子量が30,000ダルトンであるために、血漿中のアルブミンなど、低分子タンパク分画が透過できない。そ

のため、十分な透水効果が得られず、フィブリノーゲンの高度な濃縮ができず、結果として、フィブリン糊製造に際して凝固時間が長く、安定性の悪い製剤しか得られない、④濃縮倍率が十分でなく、ろ過濃縮した血漿をさらに濃縮しなければ、フィブリン糊の製造に至適なフィブリノーゲン濃度が得られない、⑤分画分子量が30,000ダルトンであるために、プロトロンビンとフィブリノーゲン濃縮血漿から分離できず、保存期間中に凝固してしまう可能性がある、などの問題点があった。

発明の開示

本発明の課題は、再生医療において細胞増殖・分化を行うのに適した性能のよい足場材を提供することである。さらには、迅速・簡便で、感染の危険性のない安全かつ安定なフィブリン濃縮物の製造方法及び製造システムを提供することである。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、短時間冷却及び急速解凍による方法（改良クリオ法）により得られたフィブリノーゲン濃縮物、及び特定のカットオフ値を有する血漿分離膜を用いることによって得られたフィブリノーゲン濃縮物が、優れた再生医療の足場材であることを見出した。さらに中空糸膜である血漿分離膜を組み込んだフィブリノーゲン濃縮システムを考案し、本発明の完成に至った。

すなわち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) フィブリン組成物を人体組織の再生及び細胞増殖に用いる場合において、ヒト血漿から、短時間・粗精製工程により得られたフィブリノーゲン濃縮物と、フィブリノーゲン活性化物との混合物を含むことを特徴とするフィブリン含有生物学的足場材。

(2) 前記フィブリノーゲン濃縮物が、血漿を短時間冷却工程、急速解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程を含む方法によって得られたものである(1)に記載のフィブリノーゲン含有生物学的足場材。

(3) 前記フィブリノーゲン濃縮物が、フィブリノーゲン回収率が15%から32%の範囲になるよう血漿から沈殿させて得られたものである(1)または(2)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(4) 前記フィブリノーゲン濃縮物が、血漿を10分から60分間の冷却工程、15分から60分間の解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程を含む方法によって得られたものである(1)～(3)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(5) 冷却工程を -20°C から -40°C で行い、解凍工程を -10°C から $+15^{\circ}\text{C}$ で行う(3)または(4)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(6) 前記フィブリノーゲン濃縮物が、ヒト血漿から血漿成分分画装置を用いて得られたものである(1)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(7) 前記血漿成分分画装置が血漿成分分画用の中空糸膜を内蔵したものである(6)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(8) 前記中空糸膜の素材が、親水化ポリスルホン、EVAL(エチレンービニルアルコール共重合体)、PAN(ポリアクリロニトリル)、CDA(セルロースジアセテート)、CTA(セルローストリアセテート)からなる群から選ばれる何れか一つである(7)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(9) 前記中空糸膜素材が、親水化ポリスルホンまたはEVAL(エチレンービニルアルコール共重合体)である(8)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(10) 前記中空糸膜のカットオフ値が80,000ダルトン以上300,000ダルトン以下である(6)～(9)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(11) 前記中空糸膜のカットオフ値が150,000ダルトン以上400,000ダルトン以下である(6)～(9)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(12) 前記フィブリノーゲン濃縮物が、血漿成分分画装置における中空糸の中空部にヒト血漿を流通させ、その際に、中空糸内壁から外壁に主として液体

成分を透過させることにより、中空糸の末端から得られたものである(6)～(11)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(13) 前記中空部に流入させる単位時間あたりの当該患者血漿の量 B_{in} と、中空糸末端より単位時間あたりに採取するフィブリノーゲン濃縮液の量 B_{out} との比 B_{in}/B_{out} が、2～20の範囲である(12)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(14) 前記 B_{in}/B_{out} 比が5～10の範囲である(12)または(13)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(15) 前記フィブリノーゲン濃縮物が、血漿成分分画装置における中空糸の外壁にヒト血漿を接触させ、その際に、中空糸外壁から内壁に主として液体成分を透過させることにより、中空糸の外部に接触させている血漿を濃縮して得られたものである(6)～(14)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(16) 液体成分を透過させる際に、中空糸の中空部を減圧にし、吸引によって中空糸外部より中空糸内部に透過させる(15)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(17) 前記中空糸の外壁に接触させる血漿の量 $C_{initial}$ と主として液体成分を透過させて、中空糸の外部に接触させている当該血漿を濃縮し得られるフィブリノーゲン濃縮液の量 C_{end} の比、 $C_{initial}/C_{end}$ 比が2～20の範囲である(15)または(16)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(18) 前記 $C_{initial}/C_{end}$ 比が5～10の範囲である(15)～(17)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(19) 前記中空糸の外壁に接触させる当該患者血漿の量が $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ 、接触させる中空糸の外表面積が $0.001 \sim 1 \text{ m}^2$ 、吸引による差圧が $0.001 \sim 0.08 \text{ MPa}$ とする(15)～(18)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(20) 前記フィブリノーゲン活性化物質がトロンビンである(1)～(1

9) の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(21) 前記トロンビンが、フィブリンノーゲンと同一人の血液から得られたものである(20)に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(22) 血管内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、脾細胞及び造血幹細胞からなる群から選ばれる細胞の培養のために使用する(1)～(21)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(23) 血管内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、脾細胞及び造血幹細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種の細胞を、生物学的足場材無しあるいは精製フィブリンノーゲン濃縮物を対照とした時、対照を上回る細胞増殖活性を有する(1)～(22)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

(24) (1)～(23)の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材を用いて細胞を培養することを含む細胞培養または組織再生のための方法。

(25) 前記細胞が、血管内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、脾細胞及び造血幹細胞からなる群から選ばれる(24)に記載の方法。

(26) 前記細胞が、フィブリンノーゲン濃縮物の原料とした血漿を採取した人と同一人に由来する(24)または(25)に記載の方法。

(27) 細胞増殖・分化刺激物質の存在下で培養を行う(24)～(26)の何れかに記載の方法。

(28) 前記細胞増殖・分化刺激物質が、血小板から放出される物質である(27)に記載の方法。

(29) 前記血小板から放出される物質が、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、かつ白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、フィルターからの通過画分を得る工程；

(2) (1)で得られた通過画分を、血小板を吸着し、赤血球を通過させる第2段

フィルターに通し、血小板が吸着したフィルターを得る工程；

(3)(2)で得られたフィルターに、血小板活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質の含有液を得る工程：を含む方法によって得られる(28)に記載の方法。

(30) 前記血小板活性化物質が、ATP、ADP、コラーゲン、及びトロンビンから成る群から選ばれる少なくとも1つの物質である(29)に記載の方法。

(31) 前記細胞増殖・分化刺激物質が、白血球から放出される物質である(27)に記載の方法。

(32) 前記白血球から放出される物質が、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2)(1)で得られたフィルターに白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化白血球放出物質の含有液を得る工程；を含む(31)に記載の方法。

(33) 前記細胞増殖・分化刺激物質が血小板から放出される物質と白血球から放出される物質の混合物である(27)に記載の方法。

(34) 前記血小板から放出される物質と白血球から放出される物質との混合物が、下記の工程：

(1) 赤血球と血漿を通過させ、血小板と白血球を吸着するフィルターに全血を通し、血小板と白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2)(1)で得られたフィルターに、血小板活性化物質と白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質と活性化白血球放出物質の含有液を得る工程を

含む方法によって得られることを特徴とする(33)に記載の方法。

(35) 細胞が、人由来の細胞をフィルターに通すことによって得られる(24)～(34)の何れかに記載の方法。

(36) フィブリノーゲン濃縮物の原料である血漿が、人血液をフィルターに通すことによって得られたものである(24)～(34)の何れかに記載の方

法。

(37) (24) ~ (36) のいずれかに記載の方法によって得られる足場材に担持された細胞培養物または再生組織。

(38) (37) に記載の細胞培養物または再生組織を、損傷を受けた組織に塗布または移植片として用いる組織再生促進方法。

(39) (1) ~ (23) の何れかに記載の生物学的足場材と細胞を混合した混合物を、損傷を受けた組織に添加する工程を含む組織再生促進方法。

(40) 前記細胞が、血管内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、膵細胞及び造血幹細胞からなる群から選ばれる少なくとも一つの細胞である (39) に記載の組織再生促進方法。

(41) フィブリン含有生物学的足場材を得るための濃縮システムであって、以下の手段：

(1) ヒト血漿を血漿成分分画膜によって粗精製する手段；

(2) ヒト血漿を前記膜表面に導入する手段；

(3) 前記膜表面からフィブリノーゲン濃縮物を得る手段；

を含むフィブリノーゲン濃縮システム。

(42) 前記血漿成分分画膜のカットオフ値が80,000ダルトン以上300,000ダルトン以下であることを特徴とする (41) に記載のシステム。

(43) 前記血漿成分分画膜のカットオフ値が150,000ダルトン以上400,000ダルトン以下であることを特徴とする (41) に記載のシステム。

(44) 前記血漿成分分画膜が中空糸膜である (42) 又は (43) に記載の濃縮システム。

(45) 前記中空糸膜の素材が、親水化ポリスルホン、EVAL(エチレンービニルアルコール共重合体)、PAN(ポリアクリロニトリル)、CDA(セルロースジアセテート)、CTA(セルローストリアセテート)からなる群から選ばれる何れか一つであることを特徴とする (44) に記載のシステム。

(46) 前記中空糸膜素材が、親水化ポリスルホン、または EVAL(エチレン

ービニルアルコール共重合体)である(45)に記載のシステム。

(47) 前記導入手段が、前記分画装置に設けた流通口の一つから中空糸膜の内表面または外膜表面にヒト血漿を導入し、別の流通口から導出させる送液装置または吸引装置である(41)～(46)の何れかに記載の濃縮システム。

(48) 前記濃縮物を得る手段が、前記分画装置に設けた流通口の一つに接続される濃縮物貯留手段である(41)～(47)の何れかに記載の濃縮システム。

(49) 前記粗精製手段が、容器に内蔵された中空糸膜の両端部を、中空内部が容器外部に流通するようにポッティングしてなる血漿成分分画装置である(41)～(48)の何れかに記載の濃縮システム。

(50) 前記粗精製手段が、容器に内蔵された中空糸膜の一端を中空内部が容器外部に流通するようにポッティングし、他端を封止してなる血漿成分分画装置である(41)～(48)の何れかに記載の濃縮システム。

(51) 血漿成分分画装置における中空系の中空部にヒト血漿を流通させ、その際に、中空系内壁から外壁に主として液体成分を透過させて中空系の末端よりフィブリノーゲン濃縮液を採取する(49)に記載の濃縮システムの運転方法。

(52) 前記中空部に流入させる単位時間あたりの当該患者血漿の量 B_{in} と、中空系末端より単位時間あたりに採取するフィブリノーゲン濃縮液の量 B_{out} との比 B_{in}/B_{out} が2～20の範囲である(51)に記載の濃縮システムの運転方法。

(53) 前記 B_{in}/B_{out} 比が5～10の範囲である(52)に記載の濃縮システムの運転方法。

(54) 血漿成分分画装置における中空系の外壁にヒト血漿を接触させ、その際に、中空系外壁から内壁に主として液体成分を透過させて、中空系の外部に接触させている当該血漿を濃縮し、フィブリノーゲン濃縮液を得る(50)に記載の濃縮システムの運転方法。

(55) 血漿を、中空系の外壁に接触させ、その際に、中空系外壁から内壁

に主として液体成分を透過させる際、中空糸の中空部を減圧にし、吸引によって該成分を中空糸外部より中空部内に透過させる（５４）に記載の濃縮システムの運転方法。

（５６） 前記中空糸の外壁に接触させる血漿の量 $C_{initial}$ と主として液体成分を透過させて、中空糸の外部に接触させている当該血漿を濃縮し得られるフィブリノーゲン濃縮液の量 C_{end} の比、 $C_{initial}/C_{end}$ 比が 2 ～ 20 の範囲である（５５）に記載の濃縮システムの運転方法。

（５７） 前記 $C_{initial}/C_{end}$ 比が 5 ～ 10 の範囲である（５４）に記載の濃縮システムの運転方法。

（５８） 前記中空糸の外壁に接触させる当該患者血漿の量が $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ 、接触させる中空糸の外表面積が $0.001 \sim 1 \text{ m}^2$ 、吸引による差圧が $0.001 \sim 0.08 \text{ MPa}$ とする（５４）～（５７）の何れかに記載の濃縮システムの運転方法。

（５９） 下記の手段：

（１）カットオフ値が 80,000 ダルトン以上 300,000 ダルトン以下の血漿成分分画膜によってヒト血漿を分画して、フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿に分離する手段；

（２）前記フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿とをそれぞれ回収する手段；

（３）前記フィブリノーゲン濃縮物からフィブリン糊を製造する手段；

（４）残りの分画血漿を再利用する手段；

を含むフィブリン含有生物学的足場材を製造するためのシステム。

（６０） 下記の手段：

（１）カットオフ値が 150,000 ダルトン以上 400,000 ダルトン以下の血漿成分分画膜によってヒト血漿を分画して、フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿に分離する手段；

（２）前記フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿とをそれぞれ回収する手段；

（３）前記フィブリノーゲン濃縮物からフィブリン糊を製造する手段；

(4) 残りの分画血漿を再利用する手段；

を含むフィブリン含有生物学的足場材を製造するためのシステム。

(6 1) 前記ヒト血漿が連続的体外循環によって採取された血漿である (5 9) 又は (6 0) に記載のシステム。

(6 2) 前記ヒト血漿を採取する手段が、全血から血漿を分離する手段を含む (5 9) から (6 1) の何れかに記載のシステム。

(6 3) 前記ヒト血漿を分離する手段が、重力分離、遠心分離あるいは膜分離手段である (5 9) ～ (6 2) の何れかに記載のシステム。

(6 4) フィブリノーゲン濃縮物を得るためのヒト血漿から活性化トロンビン血漿を調製する (5 9) ～ (6 3) の何れかに記載のシステム。

(6 5) 前記フィブリノーゲン濃縮物から活性化トロンビン液を得る (5 9) ～ (6 4) の何れかに記載のシステム。

(6 6) 血漿成分分面膜によって分画して得た残りの分画血漿を、活性化トロンビン血漿の調製に用いる (5 9) ～ (6 5) の何れかに記載のシステム。

(6 7) 血漿成分分面膜によって分画して得た残りの分画血漿を、血漿分離手段によって血漿が分離された血漿分離血液と混合して人体に返還する (5 9) ～ (6 6) の何れかに記載のシステム。

(6 8) 前記回収手段が、得られるフィブリノーゲン濃縮物を単独ドナー由来のフィブリノーゲン濃縮血漿として貯蔵する手段を含む (5 9) ～ (6 7) の何れかに記載のシステム。

(6 9) 前記フィブリン糊を製造する手段が、フィブリノーゲン濃縮物とフィブリン安定化因子及びフィブリノーゲン活性化因子と混合する手段を含む (5 9) ～ (6 8) の何れかに記載のシステム。

(7 0) 下記の工程：

(1) カットオフ値が 80,000 ダルトン以上 300,000 ダルトン以下の血漿成分分面膜によってヒト血漿を分画して、フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿に分離する工程；

(2) 前記フィブリノーゲン濃縮物フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿と残りの分画血漿とをそれぞれ回収する工程；

(3) 前記フィブリノーゲン濃縮物フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿からフィブリン糊を製造する工程；

(4) 及び、残りの分画血漿を再利用する工程；
を含むフィブリン含有生物学的足場材の製造方法。

(71) 下記の工程：

(1) カットオフ値が150,000ダルトン以上400,000ダルトン以下の血漿成分分面膜によってヒト血漿を分画して、フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿に分離する工程；

(2) 前記フィブリノーゲン濃縮物フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿と残りの分画血漿とをそれぞれ回収する工程；

(3) 前記フィブリノーゲン濃縮物フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿からフィブリン糊を製造する工程；

(4) 及び、残りの分画血漿を再利用する工程；
を含むフィブリン含有生物学的足場材の製造方法。

(72) 前記ヒト血漿が連続的体外循環において採取される工程を含む(70)又は(71)に記載の方法。

(73) 前記ヒト血漿を採取する工程が、全血から血漿を分離する工程を含む(70)～(72)の何れかに記載の方法。

(74) 血漿を分離する工程が、重力分離、遠心分離、あるいは膜分離工程である(70)～(73)の何れかに記載の方法。

(75) 血漿成分分面膜によって分画して得た残りの分画血漿を、血漿分離手段によって血漿が分離された血漿分離血液と混合して人体に返還する工程を含む(70)～(74)の何れかに記載の方法。

(76) 前記回収工程が、得られるフィブリノーゲン濃縮物を単独ドナー由来のフィブリノーゲン濃縮血漿として貯蔵する工程を含む(70)～(75)の

何れかに記載の方法。

(77) フィブリン糊を製造する工程が、フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿とフィブリン安定化因子及びフィブリノーゲン活性化因子と混合する工程を含む(70)～(76)の何れかに記載の方法。

本発明によって、再生医療において細胞増殖・分化を行うのに適した性能のよい足場材の製造、さらには、迅速・簡便で、感染の危険性のない安全かつ安定なフィブリン濃縮物の製造方法及び製造システムを構築することができる。

図面の簡単な説明

図1は、Endstop法によるフィブリノーゲン濃縮システムを示す図である。

図2は、Discard法によるフィブリノーゲン濃縮システムを示す図である。

図3は、Aspirate法によるフィブリノーゲン濃縮システムを示す図である。

図4は、血液バッグに組み込まれたAspirate法によるフィブリノーゲン濃縮システムを示す図である。

図5は、血液バッグに組み込まれたAspirate法によるフィブリノーゲン濃縮システム(多段吸引)を示す図である。

図1～5において、1は原料血漿、2は主として液体成分、3は濃縮液、4は中空糸膜、5は原料血漿入り口、6は濃縮液出口、7はバルブ、8は、末端が封止されたあるいは末端がループ状の中空糸膜、そして9も、末端が封止されたあるいは末端がループ状の中空糸膜を示す。

図6は本発明の生物学的足場材の製造システムを組み込んだ血液処理装置の一例を示す。

図7は本発明で用いる血漿分離カラムおよび血漿成分分画カラムの一例を示す。

図8は本発明で用いる活性化トロンビン血漿調製装置の一例を示す。

図6～8において、11はCPD添加全血貯留槽、12は血漿貯留槽、13はろ過血漿貯留槽、14は濃縮血漿貯留槽、15は血漿分離カラム、16は血漿成分分画カラム、17～20は血液回路用ポンプ、21は血液または血漿入口、2

2は血漿除去多血球分画または濃縮血漿出口、23は血漿またはろ過血漿出口、24は中空繊維膜、31はろ過血漿入口、32は塩化ビニル製血漿貯留バッグ、33はカルシウム溶液、そして34はシリコンビーズを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について具体的に説明する。

「生物学的足場材」とは、細胞が組織再生の場に定着・増殖・分化し、組織を再構築するための支持構造（足場）を構成する材料として定義される。生物学的足場の役割としては、上記のとおり、細胞の定着・増殖・分化促進以外に再生のためのスペース確保、細胞への酸素と栄養素の供給、細胞増殖因子の貯蔵などが挙げられる。実際の生体組織における生物学的足場材としては、コラーゲン、ラミニニン等細胞外マトリクスと呼ばれる生体高分子が挙げられる。また、これら生体高分子以外にも、各種の合成高分子、無機材料からなる生物学的足場材の研究開発が行われている。最近の研究によればフィブリンが、生物学的足場材の活性を有することが報告されている（Cell Transplantation、7、309-317、1998；及び、Burn、24、621-630、1998等）。

本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、ヒト血漿から、短時間・粗精製工程により得られたフィブリノーゲン濃縮物と、フィブリノーゲン活性化物との混合物を含んでいる。

上記のフィブリノーゲン濃縮物は、一形態として、血漿を短時間冷却工程、急速解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程（例えば、遠心分離工程）を含む方法によって得られたものである。

具体的には、上記のフィブリノーゲン濃縮物は、血漿を10分～60分間の冷却工程、15分～60分間の解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程を含む方法によって得ることができる。また、好ましくは、冷却工程は -20°C から -40°C で行い、解凍工程は -10°C ～ $+15^{\circ}\text{C}$ で行うことができる。原料となる血漿は、生体適合性の点から、ヒトを対象とする場合はヒトの血漿を

用い、また動物を対象とする場合はその動物の血漿を用いることが好ましい。

上記フィブリノーゲン濃縮物を得るための手法のより具体的な態様は以下の通りである。まず、全血を遠心分離(4℃)して得た血漿を、-30℃程度の低温で30分間静置して凍結させ、次に、-2.5℃で30分間放置し、続いて、12℃で30分間放置する。続いて、4℃で30分間放置し、最後に遠心分離(1,000g×15分、1℃)して上清を除去し、フィブリノーゲン濃縮物を得ることができる。あるいは別法としては、全血を遠心分離(1,000g×15分、4℃)して得た血漿を、-30℃程度の低温で60分間静置して凍結させた後、-5℃で30分間放置し、その後、4℃で30分間放置する。最後に遠心分離(1,000g×15分、1℃)して上清を除去し、フィブリノーゲン濃縮物を得ることができる。

なお、遠心分離操作以外にも、デカンテーションやろ過等でフィブリノーゲン濃縮物を得ることも可能であるので、本発明は遠心分離操作に限定されるものではない。

これらの方法は、フィブリノーゲン濃縮物を血漿から1～2時間という短時間で得る方法であり(特表2001-513073号参照)、本明細書において、「改良クリオ法」と呼ぶ。

上記のように得られた本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、フィブリノーゲン回収率が15%～32%の範囲になるように血漿から沈澱させて得られたフィブリノーゲン濃縮物を含む。

上記の冷凍融解による方法(改良クリオ法)では、実施例に記載したように、回収率が15～32%の範囲になるように調整すると生物学的足場材としての活性が高いことを本発明者らは見出した。

本明細書において、「フィブリノーゲン回収率」とは、下記式によって得ることができる値をいう。

フィブリノーゲン回収率=(フィブリノーゲン濃縮物中に含まれるフィブリノーゲン量/フィブリノーゲン濃縮物の調製に用いる出発物質である血漿中に含まれるフィブリノーゲン量)×100。

フィブリノーゲンの定量は、試料にトロンビンと Ca^{2+} を加え、フィブリンクロットの生成時間を測定するトロンビン時間法、生成クロットを秤量する重量法、抗フィブリノーゲン抗体を用いる免疫学的測定法等のいずれでもよいが、操作の簡便性の点から、トロンビン時間法で行うことが好ましい。

本発明の別の側面によれば、フィブリノーゲン濃縮液は、中空糸膜を内蔵した血漿成分分画装置による濃縮操作によっても、1～2時間という短時間で、好適に得ることができる。濃縮に用いる中空糸は、カットオフ値として、フィブリノーゲンは透過せず、主として液体成分は透過する値が好ましい。カットオフ値とは、阻止率90%の溶質（通常ポリエチレングリコールを用いる）の分子量として定義される。この場合、主として液体成分とは、フィブリノーゲンよりサイズの小さな物質の共存する液体成分を指す。フィブリノーゲンよりサイズの小さな物質として、アルブミンは、目的や条件に応じて透過させる場合と透過させない場合がありうる。適当な中空糸を選択することによって、透過液の成分として透過させる場合あるいは透過させずに濃縮液中に残存させる場合に対応させる。

カットオフサイズとして好ましいのは、30,000～1,500,000 ダルトンであり、さらに好ましくは50,000～900,000 ダルトンである。この範囲であれば～350,000 ダルトンのフィブリノーゲンを効果的に濃縮し、かつ適当な運転条件によって、処理量を確保することができる。この範囲の中で、目的に応じて、さらに好適なカットオフサイズの中空糸膜を選択することができる。分画分子量 80,000～300,000 を選択すると、分子量の比較的小さい、成長因子なども同時に濃縮することが可能であり、目的によって好適に選択される。また、分画分子量 150,000～400,000 を選択すると、成長因子等の比較的低分子量成分の濃縮度は高くないが、比較的高分子のマトリクス蛋白が、フィブリノーゲンと同時に濃縮され、かつ濃縮操作時における圧力上昇を十分低く維持することができ、特に、濃縮操作時間の短縮において有効である。分画分子量が350,000 ダルトンを超える膜を使用すると、ある程度のフィブリノーゲンのリークが起こりうる。この場合でも、分画分子量が1,500,000 ダルトン以下であれば、一定の濃縮度を得ることができ、

条件によっては、濃縮度が比較的低い場合、たとえば、3～5倍の濃縮度であっても、十分な細胞増殖能を得ることができる。

中空糸でのフィブリノーゲン濃縮では、凍結融解法(クリオ法、改良クリオ法など)とは異なり、生物学的足場材として有用な成分もフィブリノーゲンと一緒に濃縮される傾向があり、フィブリノーゲンの回収率が高くても生物学的足場材としての活性は高いことが多い。中空糸法でのフィブリノーゲン回収率は低い場合で20%程度だが、高い場合は100%近くの高回収率も実現できる。

中空糸素材は目的や条件に応じて適宜選択することができる。ポリエチレン、エチレン/ビニルアルコール共重合体、ポリプロピレン、ポリ-4-メチル-2-ペンテン等のポリオレフィン樹脂、ポリフッ化ビニリデン樹脂、エチレン/テトラフルオロエチレン樹脂、ポリクロロトリフルオロエチレン樹脂等のフッ素系樹脂、ポリスルホン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン等、その他各種の合成高分子、アガロース、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸塩等の天然高分子、ハイドロキシアパタイト、ガラス、アルミナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン、アルミニウム等の金属が上げられる。

特に、疎水性の素材を採用する場合、中空糸の細孔内表面は適宜改質されているものを選択することができる。たとえば、素材表面を親水化した中空糸は、目詰まりを効果的に回避することができる場合が多く、好適に選択される。表面改質の方法は、親水性の表面を構築することが基本となる。公知の方法を目的に応じて採用することができる。たとえば、電離性の放射線照射後、熱水で処理することによって表面を親水化することが可能である。また、両親媒性の高分子をコーティングすることによっても表面改質は可能である。たとえばヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシエチルメタクリレート、ヒドロキシプロピルアクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート等のヒドロキシアクリルあるいはメタクリル系の高分子、あるいはアミン系高分子やポリエチレングリコール系高分子、または、それらの共重合体等による親水化である。これらの中で、ヒドロキ

シエチルメタクリレートとジメチルアミノエチルメタクリレート共重合体は、血液処理のコーティング剤として、実績があり、好適に採用される（特開平10-234361公報）。また、グラフト重合法はフィルター担体に化学的に親水性を有する高分子を結合させる方法で、溶出の心配が無いなどの利点を有する。特開2000-185094公報に記載された方法などが好適に採用される。

この中で、血液処理材料、たとえば透析膜や体外循環用の膜として使用実績のあるものが好適に採用され、親水化ポリスルホン、親水化ポリエーテルスルホン、ポリエーテルスルホン・ポリアリレート樹脂ポリマーアロイ、ポリアリルエーテルスルホン、エチレンービニルアルコール共重合体、ポリアクリロニトリル、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、親水化ポリプロピレン、親水性の高分子をコーティングしたポリエステルなどは、素材として、好ましく用いることができる。

ここで、前記中空糸を組み込んだフィブリノーゲン濃縮システムについて説明する。本システムは、フィブリン含有生物学的足場材を得るための濃縮システムであって、以下の手段：

- (1) ヒト血漿を血漿成分分画膜によって粗精製する手段；
- (2) ヒト血漿を前記膜表面に導入する手段；
- (3) 前記膜表面からフィブリノーゲン濃縮物を得る手段；

を含むものである。本システムの概要を図1～5に示す。図1、図2に示したのは、容器に内蔵された中空糸膜の両端部を、中空内部が容器外部に流通するようにポッティングしてなる血漿成分分画装置であり、図3～5に示したのは容器に内蔵された中空糸膜の一端を中空内部が容器外部に流通するようにポッティングし、他端を封止してなる血漿成分分画装置である。なお、図3～5に対応するシステムとして、容器に内蔵された中空糸膜の両端部を、中空内部が容器外部に流通するように、しかも、中空糸をU字型に曲げて、中空糸膜の両端部が同方向に束ねられる形式でポッティングしてなる血漿成分分画装置も構成できる。これらシステムは、上記分画装置に設けた流通口の一つから中空糸膜の内表面または外

膜表面にヒト血漿を導入し、別の流通口から導出させる送液装置または吸引装置であり、上記分画装置に設けた流通口の一つに接続される濃縮物貯留手段において、フィブリノーゲン濃縮液を好適に採取することが出来る。さらに、具体的に説明する。

中空系の中空部（内側）から外部（外側）に透過する場合で、中空部末端を封止し、血漿を処理した後、回収液によって中空系の中空部内の濃縮液を回収する方法（図 1、Endstop 法）、中空部末端を開き、連続的に中空系末端より濃縮液を採取する方法（図 2、Discard 法）、あるいは、外部から中空部へ主として液体成分を透過させる場合（図 3、Aspirate 法）がある。Endstop 法は、中空部内の容積が小さいことから、目的のフィブリノーゲンを蓄積する余裕が少なく、そのため、血漿処理中に目詰まりによる圧力上昇が生じやすいため、Endstop 法より、Discard 法の方が好適に採用される。Discard 法の場合、中空系の単位時間に中空部に流入させる当該患者血漿の量 B_{in} と、単位時間に中空系末端より採取するフィブリノーゲン濃縮液の量 B_{out} との比 B_{in}/B_{out} は、2～20 であることが好ましく、さらに好ましくは 5～10 である。この範囲であれば、圧力上昇を回避し、効果的にフィブリノーゲン濃縮液が得られる条件を設定できる。

Aspirate 法は、外部から中空部へ主として液体成分が透過する場合に相当し、外部から血漿を加圧することによって透過させる場合と、中空部内を減圧にして、吸引によって透過させる場合がありうる。吸引による場合は、濃縮液側に圧力をかけないため、目的物である濃縮液の変性を防ぐことができ、従って、加圧による場合より高い圧力を設定することが可能となる。吸引による圧力差は、原理的に大気圧以上には設定できないが、大気圧に近い圧力差、たとえば 0.05 MPa 以上の圧力差によって、効率的な濃縮操作を実現することができる。Discard 法と同様に、中空系の外壁に接触させる当該患者血漿の量 $C_{initial}$ と、得られるフィブリノーゲン濃縮液の量 C_{end} との量の比、 $C_{initial}/C_{end}$ は、2～20 が好ましく、さらに好ましくは 5～10 である。この範囲であれば、圧力上昇を回避し、効果的にフィブリノーゲン濃縮液を得られる条件を設定することができる。

さらに、Aspirate 法の好適な条件の範囲として、当該血漿の量が $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ 、接触させる中空糸の外表面積が $0.001 \sim 1 \text{ m}^2$ 、吸引による差圧が $0.001 \sim 0.08 \text{ MPa}$ が好ましい。さらに好ましくは、当該血漿の量が $1 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ 、接触させる中空糸の外表面積が $0.01 \sim 0.5 \text{ m}^2$ 、吸引による差圧が $0.01 \sim 0.08 \text{ MPa}$ である。

特に、Aspirate 法について、図を用いて、詳細に説明する。図 3 に示したのは、中空糸を一般のモジュールケースに導入した形式であるのに対して、図 4 に示したのは血液バッグに該中空糸を導入した形式である。血液バッグ中に血漿を導入し、直ちに該血漿より吸引法によってフィブリノーゲン濃縮液を得ることが可能になる。図 5 に示したのは Aspirate 法による中空糸束を複数束導入し、多段に吸引操作を行うことができるようにした形式である。図のように上下方向に設置し、上の方から吸引操作を行う。目詰まりによって圧力上昇が起こったら、次の段の中空糸束による吸引に移る。圧力上昇の目安は $0.05 \text{ MPa} \sim 0.07 \text{ MPa}$ が適当である。

Endstop 法、Discard 法、Aspirate 法のいずれも一定の濃度を有する濃縮液を得た後、別の操作によって濃縮することが可能である。例えば、遠心分離によってさらに濃縮を加える場合、あるいは凍結及び解凍によって沈殿を生じさせる場合などが相当する。中空糸による濃縮とこれら濃縮法を組み合わせることによって、高い濃縮倍率の液を効率的に得ることが可能となる。

本発明のフィブリン含有生物学的足場材はまた、フィブリノーゲン活性化物質を含む。「フィブリノーゲン活性化物質」とは、フィブリノーゲンをフィブリンへ変換する作用を有する物質をいい、具体的にはトロンビンが挙げられる。

トロンビンとしては、通常トロンビンとしての生物活性を有するもの、例えば血漿蛋白を分画して得られるもの等が使用できる。例えばヒト又はウシの血漿から、好ましくはフィブリノーゲン濃縮物の調製に用いる血漿と同一人のヒト血漿から精製したプロトロンビンに、 Ca^{2+} の存在下でトロンボプラスチンを作用させて調製したものをを用いることができる。あるいは、市販の薬局方収載品を用い

てもよい。

足場材におけるトロンビンの配合量は、フィブリノーゲン濃縮物 1 mg に対し、0.01～100単位、好ましくは0.1～10単位とすればよい。

本発明のフィブリン含有生物学的足場材には、フィブリンの形成と安定化に關与する血漿由来の物質が含まれている。フィブリンの形成と安定化に關与する血漿由来の物質としては、ファクターXIII、フィブロネクチン等が挙げられる。

本発明のフィブリン含有生物学的足場材は皮膚、軟骨、骨、肝臓、腎臓及び角膜等の再生医療に用いる細胞の培養に好適に用いることができる。細胞としては、例えば、ヒト由来の幹細胞（特に、骨髓由来間葉系幹細胞）、内皮細胞、上皮細胞、実質細胞（特に、肝実質細胞）、線維芽細胞、角化細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、造血幹細胞等が挙げられる。

本発明のフィブリン含有生物学的足場材を用いて上記の細胞を培養する方法について述べる。細胞培養の方法としては特に制限はないが、足場材に細胞と培地の混合物を加え、所定雰囲気下、所定温度で放置する方法等を用いることができる。

培地は、特に制限はなく、血清培地及び無血清培地のいずれもが使用可能である。血清培地としては、MEM培地、BME培地、DME培地、 α MEM培地、IMEM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地、RPMI培地、および上記培地の混合培地等の基礎培地に血清を加えたもの等が挙げられる。

細胞培養の雰囲気については、特に制限はなく、例えば、二酸化炭素と空気の混合物等の雰囲気が使用できる。細胞培養の培養温度は、細胞の増殖・分化が活発に行えるという点で、10～50℃が好ましく、30～40℃が特に好ましい。以上の方法に従って得られた培養物を足場材から剥離させ、回収するための方法としては、周囲温度又は足場材の温度を下げる方法、培地を低温の培地に交換する方法、EDTA等のキレート剤の添加、トリプシン又はコラゲナーゼ等の酵素処理による方法、セルスクレーパーによる機械的な剥離による方法などが挙げら

れる。

また、上記の細胞培養は、細胞増殖・分化刺激物質の存在下で培養を行ってもよい。細胞増殖・分化刺激物質としては、下記の手法にて得られる血小板から放出される物質、白血球から放出される物質、及びこれらの混合物等が好適である。あるいは、細胞増殖・分化刺激物質として通常再生医療分野で用いられている、線維芽細胞増殖因子、トランスフォーミング増殖因子、インシュリン様増殖因子、肝細胞増殖因子、血管内皮細胞増殖因子、ヘパリン結合上皮細胞増殖因子、結合組織成長因子等の細胞増殖因子等を使用してもよい。

上記の血小板から放出される物質とは、具体的には、ATP、ADP、コラーゲン、トロンビン等が挙げられる。

当該血小板から放出される物質は、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、フィルターからの通過画分を得る工程；

(2) (1) で得られた通過画分を、血小板を吸着し、赤血球を通過させる第2段フィルターに通し、血小板が吸着したフィルターを得る工程；

(3) (2) で得られたフィルターに、血小板活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られる。

この工程(1)で用いる第1段フィルターの例としては、特表平11-508813号公報等に記載のフィルターなどが挙げられる。また、工程(2)で用いる第2段フィルターの例としては、特公平2-13587号公報等に記載のフィルター等が挙げられる。

ここで、血小板活性化物質とは、ATP、ADP、エピネフリン、コラーゲン、トロンビン、トリプシンやラテックス粒子等を言う。また、血小板活性化物質を含む回収液とは、これらの血小板活性化物質を生理食塩水、磷酸緩衝液等の適当な緩衝液、アルブミン溶液あるいはこれらの混合液に溶解したものを言い、血小板活性化物質を含む回収液は、血小板を上記血小板活性化物質と接触させること

により得ることができる。

一方、上記の白血球から放出される物質は、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに、白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化白血球物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られることできる。

ここで、白血球活性化物質とは、白血球自身に含まれていて白血球の増殖・分化・接着・遊送能等を刺激する活性を有する物質（例えば fMLP ペプチド、TNF、IL-1、IL-6 等のサイトカイン）あるいは抗T細胞抗体などが挙げられる。白血球活性化物質を含む回収液は、界面活性剤・適当な緩衝液・低張液との接触や、白血球の物理的破壊等により得ることができる。

さらに、血小板から放出される物質と白血球から放出される物質との混合物は、下記の工程：

(1) 赤血球と血漿を通過させ、血小板と白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、血小板と白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに、血小板活性化物質と白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質と活性化白血球放出物質の含有液を得る工程；

を含む方法によって得られる。

工程(1)で用いる第1段フィルターの例としては、特公平2-13587号公報に記載のフィルター等が挙げられる。

上記の各操作に用いるフィルターは、例えば、不織布型（平板状の積層型あるいは円筒状の積層型）、中空膜糸型、多孔質膜型のフィルター等が好適である。白血球除去・血小板通過フィルター（WO 01/32236号公報等）、白血球、血小板除去フィルター（特公平02-13587号公報等）など公知の分離フィルターを用いればよい。

また、こうして得られた血小板から放出される物質、および白血球から放出される物質はフィブリン糊を足場材としない再生医療にも、分化、増殖の刺激剤としても用いることができる。

本発明の足場材は、後記実施例に示されるように、線維芽細胞に対する接着能、走化性、及び細胞増殖促進活性に優れている。また、血管内皮細胞に対する細胞増殖促進活性にも優れている。さらに後記実施例に示されるように、本発明の方法によって得られる活性化血小板及び活性化白血球からの放出物質は、線維芽細胞及び血管内皮細胞に対する細胞増殖促進活性を有する。すなわち、本発明の足場材を糖尿病、閉塞性動脈疾患（ASO）、その他難治性潰瘍等の皮膚の損傷、いわゆる創傷の治療に用いることにより、創傷部位において線維芽細胞及び血管内皮細胞の遊走・増殖が必要とされる、炎症反応期及び増殖期（肉芽期）と呼ばれる治癒過程に対し、治癒促進効果を付与することが可能となる。よって、本発明の足場材は、創傷の治療にも有効である。

本発明はまた、フィブリン含有生物学的足場材の製造システムをも提供する。この製造システムは、下記の手段：

- （１）カットオフ値が 80,000 ダルトン以上 900,000 ダルトン以下の血漿成分分画膜によってヒト血漿を分画して、フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿に分離する手段；
- （２）前記フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿とをそれぞれ回収する手段；
- （３）前記フィブリノーゲン濃縮物からフィブリン糊を製造する手段；
- （４）残りの分画血漿を再利用する手段；

を含むものである。

本発明の生物学的足場材の製造システムは、例えば、図 5 に示すような血液処理装置に組み込むことが可能である。血液処理装置は、生体から採取した血液を血漿分離用の第 1 のろ過カラム（15）に通し、第 1 のろ過カラムによって分離した血漿は第 2 のろ過カラム（16）によって成分分離して、生体に返還するという 2 重ろ過法によるシステムである。

図5に示すように、従来の血液処理装置は、血漿成分を分画するための第2のろ過カラムによって、LDL、VLDL等の高分子画分を取り除き、血漿粘度を下げることによって、動脈硬化による血管閉塞症や高脂血症を予防・治療するためのものであって、ろ過膜によって分離された高分子画分は廃棄していた。

本発明の一つの態様は、従来廃棄していた高分子画分を利用して、フィブリン含有生物学的足場材の材料に適するフィブリノーゲンを多く含む画分を得ようとするもので、そのために血漿成分分画のための第2のろ過カラムに特定のカットオフ値を有するろ過膜を用いることを特徴とする。

血漿成分分画のためのろ過膜としては、フィブリノーゲン濃縮システムについて既に説明した中空糸膜を用いればよい。

本発明において、血液の採取は、生体の血管に接続された注射針やカテーテルなどを通じて行われる。

全血から血漿を採取するための血漿分離装置は、膜分離型、遠心分離型等、従来公知のいずれの装置も使用することができる。

膜分離型の血漿分離装置とは、少なくとも血球細胞を通過させない細孔径を有する中空糸型の分離膜をハウジングに充填したものであり、中空糸内部に血液を流すと、中空糸の膜壁を通して血漿成分が分離される。分離膜の材質は特に限定しないが、例えば、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリエチレン、ポリプロピレン、セルロース、酢酸セルロース、エチレンビニルアルコール、ポリアクリロニトリル、テフロン、ポリエステルなどが例示できる。このような膜分離型の血漿分離装置は、血液から一定速度で連続的に血漿を分離できるという点で特に好ましい。

また、遠心分離型の血漿分離装置とは、血液を遠心ボウルに導入し、そのボウルを回転させることで血球と血漿との比重差により分離を行う装置であり、一定量の分離が行われた時点でボウル内の血液は患者に返血され、また新たな血液がボウルに導入され遠心分離される。

本発明においては、このようにして得られたフィブリノーゲンを多く含む血漿

画分をそのままフィブリン含有生物学的足場材の製造原料に用いることができる。

フィブリン含有生物学的足場材は、本発明で得られたフィブリノーゲンを多く含む血漿画分に第XIII因子などのフィブリン安定化因子、およびトロンビノーカルシウムなどのフィブリノーゲン活性化因子とを混合することによって得られる。

一方、ろ過膜によってフィブリノーゲンを多く含む血漿分画を分離した残りの画分は、さらにプロトロンビンを変性化させトロンビンを生成することのできる何れかの方法を用いて、多トロンビン血漿を調製するのに用いることができる。

例えば、当該画分に至適な濃度のカルシウムを添加し、さらにシリコンビーズなどの陰性の表面荷電と接触させることで、このようなトロンビンの生成を行う事ができる。

さらに、第2のろ過膜によってフィブリノーゲンを多く含む血漿画分を分離した残りの画分は、そのまま、或いは血漿分離装置により得られる血漿を分離された血球を多く含む画分と混合され、供血者に対して返還することができる。

本発明では、第2のろ過膜によって分離したフィブリノーゲンを多く含む血漿画分は、貯蔵する事もできる。

例えば、血液の粘度が異常に高いために身体末梢などの血管に生じる血液の循環障害が原因となって起こる視力低下や足先壊疽などの治療のため、フィブリノーゲンなどの血中高分子蛋白を体外循環法により除去し血液粘度を低下させる、いわゆるレオフェレーシスと呼ばれる療法などに於いて、通常廃棄するフィブリノーゲンを多く含む血漿分画を貯留、凍結または冷蔵保存しておき、フィブリン含有生物学的足場材の作製原料とするなどである。これによって、通常廃棄されている患者血漿を有効に利用して、患者自身の血液から調製されるいわゆる自己フィブリン糊を作る事ができるし、また、これらを集積することにより、フィブリン含有生物学的足場材材料の貯留銀行をつくることができる。

実施例

以下、実施例により、本発明をより具体的に説明するが、本発明は下記の実施例により限定されるものではない。

実施例 1 (改良クリオ法によるフィブリノーゲン濃縮物の調製及びフィブリン含有生物学的足場材の作製)

健康人より得た新鮮血 400ml [抗凝固剤として 56ml の CPD (Citrate-phosphate-dextrose SIGMA 社製 C7165) を添加] を、50ml 用遠心チューブ (日本ベクトンディキンソン社製 No. 352070) に分注し、遠心分離 (1,000g × 15 分、4℃) (KUBOTA 社製 3740) にて血漿 235ml を得た。これをフリーザー (EEV-204N Whirlpool 社製) に移し、-27℃ にて 30 分間静置して凍結させた。次に血漿の入った遠心チューブを、チャンバー温度を -2.5℃ に設定した冷却遠心機 (KUBOTA 社製 3740) 内に移して 30 分間放置した。続いて予めチャンバーの温度を 12℃ に設定した、別の冷却遠心機に遠心チューブを移し、30 分間放置した。その後、冷蔵庫内 (SANYO 社製 Medicoool MPR-510、4℃) に 30 分間静置した。最後に遠心分離 (1,000g × 15 分、1℃) を行い、上清を除去し、フィブリノーゲン濃縮物を得た。フィブリノーゲンの定量はトロンビン時間法に基づく市販のフィブリノーゲン測定キット (Fisher Scientific 社 Pacific Hemostasis キット) を用い、測定手順はメーカー添付の手順書に従った。回収したフィブリノーゲン量は 40.2mg。原料とした血漿に含まれるフィブリノーゲン量の測定結果は 198mg であり、回収率は 20.3% ($40.2/198 \times 100 = 20.3$) であった。フィブリノーゲン濃縮物と、50mM 塩化カルシウム (Sigma 社製 C5080) を含むヒト血漿トロンビン溶液 (Sigma 社製 T8885) (5.0 NIH units/ml) とを素早く等量混合し、フィブリン含有生物学的足場材を作製した。

実施例 2 (改良クリオ法 (別法) によるフィブリノーゲン濃縮物の調製及びフィブリン含有生物学的足場材の作製)

健康人より得た新鮮血 40ml [抗凝固剤として 5.6ml の CPD

(Citrate-phosphate-dextrose SIGMA 社製 C7165) を添加]を、50ml 用遠心チューブ (日本ベクトンディキンソン社製 No. 352070) に集め、遠心分離 (1,000g×15 分、4℃) (KUBOTA 社製 3740) により、血漿 20.5ml を得た。これをフリーザー (EEV-204N Whirlpool 社製) に移し、-30℃にて60分間静置して凍結させた。次に血漿の入った遠心チューブを、チャンバー温度を-5℃に設定した冷却遠心機 (KUBOTA 社製 3740) 内に30分間放置した。その後、冷蔵庫内 (SANYO 社製 Medicoool MPR-510、4℃) に30分間静置した。最後に遠心分離 (1,000g×15分、1℃) を行い、上清を除去し、フィブリノーゲン濃縮物を得た。回収したフィブリノーゲン量は 7.1mg であった。原料とした血漿に含まれるフィブリノーゲン量の測定結果は 24.8mg であり、回収率は 28.6% ($7.1/24.8 \times 100 = 28.6$) であった。フィブリノーゲン濃縮物と、50mM 塩化カルシウム (Sigma 社製 C5080) を含むヒト血漿トロンビン溶液 (Sigma 社製 T8885) (5.0 NIH units/ml) とを素早く等量混合し、フィブリン含有生物学的足場材を作製した。

比較例 1 (クリオ法によるフィブリノーゲン濃縮物の調製及びフィブリン含有生物学的足場材の作製)

クリオ法によるフィブリノーゲン濃縮物の調製は、Casali らの方法に従った (Transmission、32、641-643、1992)。健常人より得た新鮮血 40ml [抗凝固剤として 5.6ml の CPD (Citrate-phosphate-dextrose SIGMA 社製 C7165) を添加]を、50ml 用遠心チューブ (日本ベクトンディキンソン社製 No. 352070) に集め、遠心分離 (1,000g×15 分、4℃) (KUBOTA 社製 3740) にて血漿 22.5ml を得た。これを超低温フリーザー (MDF-293 SANYO 社製) に移し、-80℃にて18時間凍結させた。次に 4℃に設定された冷蔵庫 (MPR-311 SANYO 社製) 内に移して16時間放置し、緩速解凍した。次に冷却遠心機にて 1,000g×15 分間遠心分離を行った (4℃)。形成された沈殿物を乱さぬように注意しながら、上記条件に従って再度凍結及び解凍を繰り返した。解凍後、再び 4℃にて 1,000g×15 分の遠心分離を行い、沈殿物を回収し、フィブリノーゲン濃縮物とした。回収したフィブリノーゲン量は 8.7

mg、元の血漿に含まれるフィブリノーゲン量の測定結果は 21.5mg であり、回収率は 40.5% ($8.7/21.5 \times 100 = 40.5$) であった。フィブリノーゲン濃縮物と 50mM 塩化カルシウム (Sigma 社製 C5080) を含むヒト血漿トロンビン溶液 (Sigma 社製 T8885) (5.0 NIH units/ml) とを素早く等量混合し、フィブリン含有生物学的足場材を作製した。

比較例 2 (エタノール沈殿法によるフィブリノーゲン濃縮物及びフィブリン含有生物学的足場材の作製)

エタノール法によるフィブリノーゲン濃縮物の調製は、Kjaergard の方法に従った (Surg Gynecol Obstet、175(1)、July、1992)。健常人から得た新鮮血 40ml [抗凝固剤として 5.6ml の CPD を添加] を 50ml 用遠心チューブ (日本ベクトンディキンソン社製 No. 352070) に入れ、600g \times 10 分間の遠心分離 (KUBOTA 社製 3740) を行い、血漿を得た。この血漿を新しい 50ml 用遠心チューブに移し、30 分かけて氷水上 (0°C) で 2.5ml のエタノール (99.5% 和光純薬株式会社製) を時々攪拌しながら添加することにより、フィブリノーゲンを沈殿させた。600g \times 15 分間の遠心分離によりフィブリノーゲン沈殿物を回収し、フィブリノーゲン濃縮物とした。回収したフィブリノーゲン量は 2.7mg。元の血漿に含まれるフィブリノーゲン量の測定結果は 21.5mg であり、回収率は 12.7% ($2.7/21.5 \times 100 = 12.7$) であった。使用まで -85°C で貯蔵した。使用前にフィブリノーゲン濃縮物を 37°C で溶解し、0.3 容の 80mM 塩化カルシウム (Sigma 社製 C5080) を含むヒト血漿トロンビン溶液 (Sigma 社製 T8885) (5.0 NIH units/ml) をすばやく混合することにより、フィブリン含有生物学的足場材を作製した。

試験例 1 (正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞に対する増殖刺激活性)

実施例 1 で調製したフィブリン含有生物学的足場材 0.5ml を 24 ウェルマルチプレート (日本ベクトンディキンソン社製 No. 353047) 上に添加し、すばやくプレート全体に行き渡るように攪拌し、プレート底面に均一な生物学的足場材を作製

した ($n=3$)。20 分後、プレート底面をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、4mM グルタミン、10%ウシ胎仔血清を含む MEM-E 培地 (大日本製薬株式会社 12-102-504) に懸濁させた 2×10^4 個の正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞 HEL299 (HEL ATCC 株番号 CCL137) を添加し、37°C、5%CO₂ 濃度の炭酸ガスインキュベータ (タバイエスペック社製 BNA121D) にて 72 時間培養した。培養後、あらかじめ 37°C に加温しておいたリン酸緩衝塩類溶液で非付着細胞を洗浄除去した。0.25%トリプシン溶液 (インビトロジェン社 15050-065) 1ml を各ウェルに添加し、プレートを 37°C、炭酸ガスインキュベータ内にて静置。30 分後、正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞を回収し、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes 社製) を用いて、メーカー添付の手順書に従い、同時に調製した正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞の検量線より、細胞数を計測した。実施例 1 で作製したフィブリン含有生物学的足場材上で培養した正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞数は、 $12.5 \pm 0.3 \times 10^4$ 個であった ($n=3$ の平均値 \pm 標準偏差)。これは後述するように比較例 1 で作製した回収率 40.5% のフィブリンノーゲン組成物を用いたフィブリン含有生物学的足場材上で培養した場合よりも有意に増加していた。

同様に実施例 2 で作製したフィブリン含有生物学的足場材上で培養した正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞に対する増殖刺激活性を測定したところ、 $8.4 \pm 0.3 \times 10^4$ 個であった ($n=3$ の平均値 \pm 標準偏差)。

同様に比較例 1 で作製したフィブリン含有生物学的足場材上で培養した正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞 (HEL) に対する増殖刺激活性を測定したところ、 $6.3 \pm 0.2 \times 10^4$ 個であった ($n=3$ の平均値 \pm 標準偏差)。

同様に比較例 2 で作製したフィブリン含有生物学的足場材上で培養した正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞に対する増殖刺激活性を測定したところ、 $4.1 \pm 0.2 \times 10^4$ 個であった ($n=3$ の平均値 \pm 標準偏差)。

実施例 1 及び 2、並びに比較例 1 及び 2 で得られたフィブリンノーゲン濃縮物におけるフィブリンノーゲン回収率及び各フィブリンノーゲン濃縮物を用いて作製したフィブリン含有生物学的足場材の正常ヒト胎児肺由来繊維芽細胞に対する増殖刺

激活性を下記表 1 にまとめた。

表 1

	フィブリノーゲン回収率 (%)	繊維芽細胞増殖活性 (細胞数 : $\times 10^4$ cells)
実施例 1	20.3	12.5 ± 0.3
実施例 2	28.6	8.4 ± 0.3
比較例 1	40.5	6.3 ± 0.2
比較例 2	12.5	4.1 ± 0.2

試験例 2 (線維芽細胞の接着能)

実施例 1 で作製した生物学的足場材の、線維芽細胞に対する接着能を測定した。実施例 1 で作製したフィブリノーゲン濃縮物 0.5ml と、50mM 塩化カルシウム (Sigma 社製 C5080) を含むヒト血漿トロンビン溶液 (Sigma 社製 T8885) (5.0 NIH units/ml) とを素早く等量混合し、24 ウェルマルチプレート (日本ベクトンディキンソン社製 No. 353047) 上にフィブリン含有生物学的足場材を作製した ($n=3$)。20 分後、フィブリン含有生物学的足場材をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、4mM グルタミン、2%ウシ胎仔血清を含む D-MEM 培地 (インビトロジェン社製) に懸濁させた 2×10^4 個の正常ヒト皮膚繊維芽細胞 (タカラバイオ社製 NHDF-Neo) を入れ、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 恒温槽にて 60 分間インキュベートした。60 分後、インキュベータから取り出し、あらかじめ 37°C に加温しておいたリン酸緩衝塩類溶液でプレートを洗浄し、付着細胞をメタノールにて固定後、Giemsa 染色を行い、光学顕微鏡にて検鏡した。実施例 1 で作製した生物学的足場材上に十分伸展している正常ヒト皮膚線維芽細胞が接着していることが確認された。

試験例 3 (線維芽細胞細胞に対する遊走能)

実施例 1 で作製したフィブリン含有生物学的足場材の線維芽細胞に対する遊走能を検討した。実施例 1 で作製したフィブリノーゲン濃縮物 0.5ml と、50mM 塩化

カルシウム (Sigma 社製 C5080) を含むヒト血漿トロンビン溶液 (Sigma 社製 T8885) (5.0 NIH units/ml) とを素早く等量混合し、24 ウェルマルチプレート (日本ベクトンディキンソン社製 No. 353047) 上にフィブリン含有生物学的足場材を作製した (n=3)。20 分後、フィブリン含有生物学的足場材をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、24 ウェルマルチプレート (日本ベクトンディキンソン社製 No. 353047) の底部にフィブリン含有生物学的足場材を形成させた。4mM グルタミン、2%ウシ胎仔血清を含む D-MEM 培地 (インビトロジェン社製) を加え、コラーゲンコートしたフィルターを装備した遊走能測定用チャンバー (日本ベクトンディキンソン社製 353431) をプレートに載せ、 2×10^4 個の正常ヒト皮膚繊維芽細胞 (タカラバイオ社製 NHDF-Neo) を添加し、37°C、5%CO₂ 恒温槽にてインキュベートした。2 時間後、膜の裏側に遊走した細胞を Giemsa 染色後に顕微鏡下に観察した。実施例 1 で作製した生物学的足場材は強い遊走能を示した。

試験例 4 (骨髄間葉系幹細胞に対する増殖刺激活性)

実施例 1 で作製した生物学的足場材の骨髄間葉系幹細胞に対する増殖活性を検討した。実施例 1 で作製したフィブリンノーゲン濃縮物 0.5ml と、50mM 塩化カルシウム (Sigma 社製 C5080) を含むヒト血漿トロンビン溶液 (Sigma 社製 T8885) (5.0 NIH units/ml) とを素早く等量混合し、24 ウェルマルチプレート (日本ベクトンディキンソン社製 No. 353047) 上に添加し、すばやくプレート全体に行き渡るように攪拌し、プレート底面に均一な足場材を作製した。次にプレート底面をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、4mM グルタミン、2%ウシ胎仔血清を含む D-MEM 培地に懸濁させた 2.5×10^4 の正常ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (タカラバイオ社製 PT034) を添加し、37°C、5%CO₂ 濃度の炭酸ガスインキュベータにて 72 時間培養した。対照として同数の骨髄間葉系幹細胞を足場材の無いプレートに培養したものを用いた。培養後、予め 37°C に加温しておいたリン酸緩衝塩類溶液で死細胞を洗浄除去した。0.25%トリプシン溶液 (インビトロジェン社 15050-065) 1ml を各ウェルに添加し、37°C、炭酸ガスインキュベータ内で静置。30 分後、骨髄間葉系幹細胞を

回収し、メーカー添付の手順書に従い、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes 社製) を用いて、同時に調製した骨髓間葉系幹細胞の検量線より、細胞数を計測した。実施例 1 で作製した生物学的足場材は、対照である足場材のないプレートと比較して、ヒト骨髓間葉系細胞に対する高い増殖活性を示した。

試験例 5 (ヒト初代肝実質細胞に対する増殖刺激活性)

実施例 1 で作製した生物学的足場材のヒト初代肝実質細胞に対する増殖活性を検討した。実施例 1 で作製したフィブリノーゲン濃縮物 0.5ml と、50mM 塩化カルシウム(Sigma 社製 C5080)を含むヒト血漿トロンビン溶液(Sigma 社製 T8885) (5.0 NIH units/ml) とを素早く等量混合し、24 ウェルマルチプレート (日本ベクトンディキンソン社製 No. 353047) 上に添加し、すばやくプレート全体に行き渡るように攪拌し、プレート底面に均一な足場材を作製した。

次にプレート底面をリン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、4mM グルタミン、2%ウシ胎仔血清を含む D-MEM 培地に懸濁させた 2.5×10^4 の正常ヒト肝細胞 (タカラバイオ社製 C2591) を添加し、37℃、5%CO₂濃度の炭酸ガスインキュベータにて 72 時間培養した。対照として同数の正常ヒト肝細胞を足場材の無いプレートに培養したものをを用いた。培養後、予め 37℃に加温しておいたリン酸緩衝塩類溶液で非付着性細胞を洗浄除去した。0.25%トリプシン溶液 (インビトロジェン社 15050-065) 1ml を各ウェルに添加し、37℃、炭酸ガスインキュベータ内で静置。30 分後、肝実質細胞を回収し、メーカー添付の手順書に従い、CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes 社製) を用いて、細胞数を計測した。実施例 1 の条件で作製した生物学的足場材は、対照である足場材のないプレートと比較して、ヒト肝実質細胞に対する高い増殖活性を示した。

実施例 3

実施例 1 と同様の方法 (改良クリオ法) 及び中空糸膜法にて、ヒト血漿よりフ

ィブリノーゲン濃縮物を調製した。

健常人より得たプール血漿（複数のドナー由来血漿）50ml[血液量400mlに対して56mlの比率でCPD（Citrate-phosphate-dextrose SIGMA社製C7165）を添加した抗凝固剤入り末梢血より遠心分離法により調製した]を、50ml用遠心チューブ（日本ベクトンディキンソン社製No.352070）に移し、 -27°C のフリーザー（EEV-204N Whirlpool社製）にて、30分間静置させ、凍結させた。次に凍結血漿の入った遠心チューブを、チャンバー温度を -2.5°C に設定した冷却遠心機（KUBOTA社製3740）内に移して30分間放置した。続いて予めチャンバーの温度を 12°C に設定した、別の冷却遠心機に遠心チューブを移し、30分間放置した。その後、冷蔵庫内（SANYO社製Medicool MPR-510、 4°C ）に30分間静置した。最後に遠心分離（ $1,000\text{g} \times 15$ 分、 1°C ）を行い、上清を除去し、ィブリノーゲン濃縮物を得た。ィブリノーゲンの定量はトロンビン時間に基づく市販のィブリノーゲン測定キット（Fisher Scientific社Pacific Hemostasisキット）を用い、測定手順はメーカー添付の手順書に従った。回収したィブリノーゲン量は 14.3mg 。原料とした血漿に含まれるィブリノーゲン量の測定結果は 86.5mg であり、回収率は 16.5% （ $14.3/86.5 \times 100 = 16.5$ ）であった。

EVALを素材とする中空糸膜（川澄化学社製EC-50W、カットオフ分子量300,000ダルトン）によるィブリノーゲン濃縮物の調製を行った。Aspirate法によって調製した。20cm500本を束ねたものを2束作成した。血漿を入れた容器に、まず1束浸漬して、中空糸内部に連結したペリスターポンプによって、中空糸内部より吸引した。100mLの血漿を25mLまで濃縮し、引き続いて次の1束を浸漬し吸引し、8mLまで濃縮した。濃縮操作に要した時間は1束目6分、2束目11分、計17分であった。濃縮液中のィブリノーゲン濃度は、 8.3mg/mL となった。原料血漿中の濃度が 1.73mg/mL であったことから、濃縮倍率4.8倍、回収率38%を得ることができた。

試験例6（ヒト胎児肺由来線維芽細胞（HEL）に対する細胞増殖刺激活性）

実施例 3 で作製した生物学的足場材の、ヒト胎児肺由来線維芽細胞 (HEL) に対する足場活性を細胞増殖刺激活性によって測定した。実施例 3 で調製した各種ヒトフィブリノーゲン濃縮物 (フィブリノーゲン濃度として 5.63mg/mL になるよう培地で調整) 0.3ml を 12 ウェルマルチプレート (日本ベクトンディキンソン社製 No. 353043) 上に添加し、さらに 20,000 個の HEL 細胞を含む 0.02mL の HEL 細胞懸濁液を添加した。0.3mL の 31.3 NIH units/ml のトロンビン溶液 (バクスター社製生物学的組織接着剤 Tisseel に添付のものを希釈して使用) をすばやくプレート全体に行き渡るように添加し、プレートを攪拌し、37℃ 5% 炭酸ガスインキュベータ (タバイエスペック社製 BNA121D) 内に静置して、ゲル化反応を進行させ、フィブリン足場材内に HEL 細胞が包埋されたものを作製した。60 分後、167 μ g/mL のアプロチニン (Sigma 社 A4529) 及び終濃度 10% のウシ胎仔血清を含む D-MEM 培地 (インビトロジェン社製) を添加し、同インキュベータ内で 96 時間培養した。細胞増殖の測定試験は、CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay キット (プロメガ株式会社) を使用した比色法にて行い、測定手順は、メーカー添付の手順書に従った。細胞増殖試験の測定結果を、同時に行った同フィブリノーゲン濃度に調整した Tisseel (バクスター社製生物学的組織接着剤) を足場としたときの細胞数 (波長 490nm における吸光度) を 1.00 としたときの相対値で示した。表 2 に示すように実施例 3 で作製した生物学的足場材は、Tisseel を足場とした時に比較していずれも高い細胞増殖活性を示し、生物学的足場活性が高いことが確認された。

表 2

足場材調製方法	細胞増殖刺激活性 (Tisseel を 1.00)
中空糸膜法	2.82
改良クリオ法	1.89
対照 (Tisseel)	1.00

実施例 4

実施例 1 と同様の方法（改良クリオ法）及び中空糸膜法にて、ウシ血漿よりフィブリノーゲン濃縮物を調製した。

ウシ血漿 50 ml [血液量 400 ml] に対して 56ml の比率で CPD (Citrate-phosphate-dextrose SIGMA 社製 C7165) を添加した抗凝固剤入り末梢血より遠心分離法により調製した] を、50ml 用遠心チューブ（日本ベクトンディキンソン社製 No. 352070）に移し、 -27°C のフリーザー（EEV-204N Whirlpool 社製）にて、30 分間静置させ、凍結させた。次に凍結血漿の入った遠心チューブを、チャンバー温度を -2.5°C に設定した冷却遠心機（KUBOTA 社製 3740）内に移して 30 分間放置した。続いて予めチャンバーの温度を 12°C に設定した、別の冷却遠心機に遠心チューブを移し、30 分間放置した。その後、冷蔵庫内（SANYO 社製 Medicoool MPR-510、 4°C ）に 30 分間静置した。最後に遠心分離（ $1,000\text{g} \times 15$ 分、 1°C ）を行い、上清を除去し、フィブリノーゲン濃縮物を得た。フィブリノーゲンの定量はトロンビン時間に基づく市販のフィブリノーゲン測定キット（Fisher Scientific 社 Pacific Hemostasis キット）を用い、測定手順はメーカー添付の手順書に従った。回収したフィブリノーゲン量は 18.7mg 。原料とした血漿に含まれるフィブリノーゲン量の測定結果は 94.1mg であり、回収率は 19.9% ($18.7/94.1 \times 100 = 19.9$) であった。

中空糸膜によるフィブリノーゲン濃縮物の調製を行った。Discard 法を採用した。素材として、①親水化ポリスルホン（カットオフ分子量 $300,000$ ダルトン）、②EVAL（カットオフ分子量 $300,000$ ダルトン）、③PAN（ポリアクリロニトリル、カットオフ分子量 $200,000$ ダルトン）、④CDA（セルロースジアセテート、カットオフ分子量 $350,000$ ダルトン）を用いた。長さ 10cm 、直径 3cm の小型モジュールにそれぞれ 2000 本を充填し、成形した。Bin/Bout を 10 に設定し、 100mL の血漿を処理した。処理血漿量は 10mL/min とした。処理時間は 10 分間であった。原料の血漿中のフィブリノーゲン濃度が 1.7mg/mL に対し、① 7.2mg/mL ② 8.1mg/mL ③ 6.5mg/mL ④ 5.9mg/mL のフ

ィブリノーゲンの濃縮液を得ることができた。

試験例 7 .(ウシ気管由来線維芽細胞 (CCL-44) に対する細胞増殖刺激活性)

実施例 4 で作製した生物学的足場材の、ウシ気管由来線維芽細胞 (ATCC 株番号 CCL-44) に対する足場活性を細胞増殖刺激活性によって測定した。実施例 4 で調製した各種ウシフィブリノーゲン濃縮物 (フィブリノーゲン濃度として 5.63mg/mL になるよう培地で調整) 0.3ml を 12 ウェルマルチプレート (日本ベクトンディキンソン社製 No. 353043) 上に添加し、さらに 2×10^4 個の CCL-44 細胞を含む 0.02mL の CCL-44 細胞懸濁液を添加した。0.3mL の 31.3 NIHunits/mL のトロンビン溶液 (バクスター社製生物学的組織接着剤 ティシールに添付のものを希釈して使用) をすばやくプレート全体に行き渡るように添加し、プレートを攪拌し、37°C 5%炭酸ガスインキュベータ (タバイエスペック社 BNA121D) 内に静置して、ゲル化反応を進行させ、フィブリン含有生物学的足場材内に CCL-44 細胞が包埋されたものを作製した。60 分後、167 μ g/mL のアプロチニン (Sigma 社 A4529) 及び終濃度 10% のウシ胎仔血清を含む Eagle' s MEM 培地 (インビトロジェン社製) を添加し、同インキュベータ内で 72 時間培養した。細胞増殖の測定試験は、CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay キット (プロメガ株式会社) を使用した比色法にて行い、測定手順は、メーカー添付の手順書に従った。細胞増殖試験の測定結果を、同時に行った同フィブリノーゲン濃度に調整した Tisseel を足場としたときの細胞数 (波長 490nm における吸光度) を 1.00 としたときの相対値で示した。表 3 に示すように実施例 4 で作製した生物学的足場材は、Tisseel を足場とした時に比較していずれも高い細胞増殖活性を示し、生物学的足場活性が高いことが確認された。

表 3 CCL-44 細胞に対する細胞増殖刺激活性

足場材調製方法	細胞増殖刺激活性 (Tisseel を 1.00)
中空糸膜法 (PS)	2.10
中空糸膜法 (EVAL)	2.00
中空糸膜法 (PAN)	2.00
中空糸膜法 (CDA)	2.33
改良クリオ法	1.88
対照 (Tisseel)	1.00

実施例 5 (活性化血小板及び白血球放出物質の調製及び細胞増殖刺激活性の測定)

以下のとおり、血小板及び白血球を捕捉させたフィルターを調製した。

健常人より新鮮末梢血 50ml [抗凝固剤として 7.0ml の CPD を添加] を得た。ポリエチレンテレフタレートの不織布 (旭化成株式会社、平均繊維径 $2.6\mu\text{m}$ 、目付け $90\text{g}/\text{m}^2$ 、厚み 0.38mm) を $25\text{mm}\phi$ に打ち抜き、これを 3 枚重ねてカラム (アドバンテック社 PP-25) にて保持し、カラムに末梢血 10ml を流した。血液処理後、10ml のリン酸緩衝塩類溶液を 10ml 通液し、洗浄した。この操作を 3 回行い、計 30ml のリン酸緩衝塩類溶液で洗浄した。処理に要する時間はいずれも 15 分以内であった。処理前後に含まれる血小板及び白血球数を自動血球計数機 (ベックマンコールター社) で計数した。不織布フィルター層に捕捉された白血球、赤血球、及び血小板の捕捉率は以下の通りであった。

白血球捕捉率 (85.3%) 赤血球捕捉率 (8.3%) 血小板捕捉率 (94.5%)

次に 0.5 NIH units/ml トロンビンを含むリン酸緩衝塩類溶液 1ml をカラムに通液し、血小板及び白血球放出物質の回収を行った。回収物質は使用まで -80°C にて凍結保存した。

試験例 8

実施例 5 にて調製した活性化血小板及び白血球放出物質を線維芽細胞に添加し、細胞増殖刺激活性を調べた。正常ヒト胎児肺線維芽細胞 2×10^4 個を 12 ウェル細胞培養用プレート（日本ベクトンディキンソン社製 353043）に播種した（培地量はウェル当たり 1 ml）。培養液は DMEM（インビトロジェン社製）にピルビン酸ナトリウム（ICN 社製）を 1mM、非必須アミノ酸（ICN 社製）、及び L-グルタミンを 2mM となるよう添加し、さらに最終濃度が 10% となるようにウシ胎児血清（StemCell Technologies 社）を加えた。コントロールとして 0.5 NIH units/ml トロンビン溶液及びリン酸緩衝塩類溶液を 100 μ L 培養系に添加した。これに実施例 5 にて調製した回収液を 100 μ L 添加し、5% 炭酸ガスインキュベータにて 3 日間培養後、細胞数を計数した。表 4 に示すように実施例 5 で作製した活性化血小板及び白血球放出物質を含む回収液は、対照であるリン酸緩衝塩類溶液及びトロンビン溶液に比較して、高い線維芽細胞増殖刺激活性を示した。

表 4 血小板及び白血球捕捉フィルター回収液による線維芽細胞増殖刺激活性

添加物	細胞数 ($\times 10^4$ cells)
回収液 (100 μ L)	9.6 \pm 0.2
対照 (トロンビン溶液 (100 μ L))	8.2 \pm 0.6
対照 (リン酸緩衝塩類溶液 (100 μ L))	7.1 \pm 0.2

試験例 9

実施例 5 にて調製した活性化血小板及び白血球放出物質を血管内皮細胞に添加し、細胞増殖刺激活性を調べた。正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 2×10^4 個を 12 ウェル細胞培養用プレート（日本ベクトンディキンソン社製 353043）に播種した（培地量はウェル当たり 1 ml）。培養液はヒト血管内皮細胞培養用無血清基礎培地（インビトロジェン社製 Cat. No. 11111-044）に最終濃度が 5% となるようにウシ胎児血清（StemCell Technologies 社）を加えた。コントロールとして 0.5 NIH units/ml トロンビン溶液及びリン酸緩衝塩類溶液を 100 μ L 培養系に添加した。

これに実施例 5 にて調製した回収液を 100 μ L 添加し、5%炭酸ガスインキュベータにて 3 日間培養後、細胞数を計数した。表 5 に示すように実施例 5 で作製した活性化血小板及び白血球放出物質を含む回収液は、対照であるリン酸緩衝塩類溶液及びトロンビン溶液に比較して、高い血管内皮細胞増殖刺激活性を示した。

表 5 血小板及び白血球捕捉フィルター回収液による血管内皮細胞増殖刺激活性

添加物	細胞数 ($\times 10^4$ cells)
末梢血溶出物 (100 μ L)	1.10 \pm 0.05
対照 (トロンビン溶液 (100 μ L))	1.01 \pm 0.06
対照 (リン酸緩衝塩類溶液 (100 μ L))	0.71 \pm 0.09

実施例 6

中空糸膜としてエチレン／ビニルアルコール共重合体を用いた。内径 175 μ m のものである (川澄化学社製 EC-50W)。

長さ 10 cm、直径 3 cm の小型モジュールに 2000 本を充填し、成形した。

Discard 法を採用した。Bin/Bout を 10 に設定し、50 mL の血漿を処理したところ、7.7mg/mL のフィブリノーゲンの濃縮液を得ることができた。処理血漿量は 10 mL/min で、処理時間は 5 分間であった。原料の血漿中のフィブリノーゲン濃度が 1.7mg/mL であるため、濃縮倍率は 4.5 倍であった。

実施例 7

実施例 6 と同じ中空糸膜を用いて Aspirate 法を試みた。20 cm 500 本を束ね、両端を接着し、血漿を入れた容器に浸漬して、中空糸内部に連結したペリスターポンプによって、中空糸内部より吸引した。200 mL の血漿を 40 mL まで濃縮したところ、フィブリノーゲン濃度は、8.9mg/mL となった。原料血漿中の濃度が 1.9mg/mL であったことから、4.7 倍の濃縮倍率を得ることができた。

実施例 8

実施例 7 と同様に Aspirate 法を試みた。20cm500 本を束ねたものを 4 束作成した。血漿を入れた容器に、まず 1 束浸漬して、中空糸内部に連結したペリスターポンプによって、中空糸内部より吸引した。200mL の血漿を 60mL まで濃縮し、引き続いて次の 1 束を浸漬し吸引した。20mL まで濃縮後、3 束目の濃縮を行い、10mL とし、4 束目で 5mL まで濃縮した。4 束目まで濃縮操作が終了するのに要した時間は、43 分であった。フィブリノーゲン濃度は、16.3mg/mL となった。原料血漿中の濃度が 1.8mg/mL であったことから、9 倍の濃縮倍率を得ることができた。

実施例 9

図 7 に示す構造の血漿分離カラムおよび血漿ろ過カラム、および図 8 に示す構造の活性化トロンビン血漿調製装置を用い、図 6 に示す血液処理用装置を組み立てた。

図 7 において、血液または血漿入口 (21) に導入された血液または血漿は、中空繊維膜 (24) を透過して、血漿除去多血球分画と血漿、または濃縮血漿とろ過血漿とに分離され、出口 (22) 及び (23) から導出される。

血漿分離カラムとしてはエチレン-ビニルアルコールにてコーティングされたポリエチレン中空繊維膜 (最大孔径 $0.3\mu\text{m}$) を使用し、血漿ろ過装置としてはセルロースジアセテート中空繊維膜 (平均孔径 $0.1\mu\text{m}$ 、カットオフ分子量 90kDa) を使用した。

CPD 加牛全血 500mL を、一定流速 100mL/分で血漿分離カラムに導入し、200mL の血漿を得た。さらに得られた血漿を、一定流速 25mL/分で血漿ろ過カラムに導入し且つ、膜を通過した血漿 (以下、ろ過血漿) を一定流速 25mL/分で血漿ろ過カラム側面に配置された出口から導出し、これを活性化トロンビン血漿調製装置に貯留した。これと並行して、膜を透過せず濃縮された血漿 (以下、濃縮血漿) を、一定流速 1mL/分で導出し、これを貯留した。

この処理によって、ろ過血漿 158mL および濃縮血漿 8mL を得ることができた。

また、血漿ろ過カラム導入前の血漿のフィブリノーゲン濃度は、2.8mg/mL、ろ過血漿のフィブリノーゲン濃度は1mg/mL未満であり、濃縮血漿のフィブリノーゲン濃度は42mg/mLであった。

ろ過血漿は、図8に示すカルシウム添加生理食塩水(33)及びシリコンビーズ(34)を充填した塩化ビニル製血漿貯留バッグ(32)からなる活性化トロンビン血漿調製装置内で、カルシウム添加生理食塩水及びシリコンビーズと混和された後、シリコンビーズを除去する為のフィルターによりろ過された。ろ過された血漿は、活性化トロンビン血漿として貯留された。

濃縮血漿8mLと活性化トロンビン血漿5mLとを混合し、フィブリン含有生物学的足場材を作製した。この時、両液混合から凝固するまでの時間は2秒未満であった。また、作製したフィブリン含有生物学的足場材を室温で24時間保存したところ、肉眼的変化は認められなかった。これらの結果から、本方法により、優れた凝固能力を有し且つ安定な、フィブリン含有生物学的足場材を調製することができることが確認された。

産業上の利用の可能性

本発明により、組織の再生に適した性能の良い生物学的足場材を提供することが可能になった。本発明のフィブリン含有生物学的足場材は、種々の細胞に対する増殖活性を有することから、組織の接着・閉鎖による止血、損傷治癒、人工骨、人工皮膚または人工臓器などの形成、肝移植手術等の治療や、アルブミンの大量生産、薬物代謝研究等に有用である。

さらに本発明により、迅速・簡便で、感染の危険性のない安全かつ安定なフィブリン含有生物学的足場材の製造方法及び製造システムが得られる。

本願が主張する優先権の基礎となる特願2002-243923及び特願2002-244294の明細書に記載の内容は全て本明細書の開示の一部として本明細書中に引用するものとする。

請求の範囲

1. フィブリン組成物を人体組織の再生及び細胞増殖に用いる場合において、ヒト血漿から、短時間・粗精製工程により得られたフィブリノーゲン濃縮物と、フィブリノーゲン活性化物との混合物を含むことを特徴とするフィブリン含有生物学的足場材。
2. 前記フィブリノーゲン濃縮物が、血漿を短時間冷却工程、急速解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程を含む方法によって得られたものである請求項1に記載のフィブリノーゲン含有生物学的足場材。
3. 前記フィブリノーゲン濃縮物が、フィブリノーゲン回収率が15%から32%の範囲になるよう血漿から沈殿させて得られたものである請求項1または2に記載のフィブリン含有生物学的足場材。
4. 前記フィブリノーゲン濃縮物が、血漿を10分から60分間の冷却工程、15分から60分間の解凍工程、及びフィブリノーゲン濃縮物を回収する工程を含む方法によって得られたものである請求項1～3の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。
5. 冷却工程を -20°C から -40°C で行い、解凍工程を -10°C から $+15^{\circ}\text{C}$ で行う請求項3または4に記載のフィブリン含有生物学的足場材。
6. 前記フィブリノーゲン濃縮物が、ヒト血漿から血漿成分分画装置を用いて得られたものである請求項1に記載のフィブリン含有生物学的足場材。
7. 前記血漿成分分画装置が血漿成分分画用の中空糸膜を内蔵したものである請求項6に記載のフィブリン含有生物学的足場材。
8. 前記中空糸膜の素材が、親水化ポリスルホン、EVAL(エチレンービニルアルコール共重合体)、PAN(ポリアクリロニトリル)、CDA(セルロースジアセテート)、CTA(セルローストリアセテート)からなる群から選ばれる何れか一つである請求項7に記載のフィブリン含有生物学的足場材。
9. 前記中空糸膜素材が、親水化ポリスルホンまたはEVAL(エチレンービニルアルコール共重合体)である請求項8に記載のフィブリン含有生物学的足場材。
10. 前記中空糸膜のカットオフ値が80,000ダルトン以上300,000ダルトン以下である請求項9に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

00ダルトン以下である請求項6～9の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

11. 前記中空糸膜のカットオフ値が150,000ダルトン以上400,000ダルトン以下である請求項6～9の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

12. 前記フィブリノーゲン濃縮物が、血漿成分分画装置における中空糸の中空部にヒト血漿を流通させ、その際に、中空糸内壁から外壁に主として液体成分を透過させることにより、中空糸の末端から得られたものである請求項6～11の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

13. 前記中空部に流入させる単位時間あたりの当該患者血漿の量 B_{in} と、中空糸末端より単位時間あたりに採取するフィブリノーゲン濃縮液の量 B_{out} との比 B_{in}/B_{out} が、2～20の範囲である請求項12に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

14. 前記 B_{in}/B_{out} 比が5～10の範囲である請求項12または13に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

15. 前記フィブリノーゲン濃縮物が、血漿成分分画装置における中空糸の外壁にヒト血漿を接触させ、その際に、中空糸外壁から内壁に主として液体成分を透過させることにより、中空糸の外部に接触させている血漿を濃縮して得られたものである請求項6～14の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

16. 液体成分を透過させる際に、中空糸の中空部を減圧にし、吸引によって中空糸外部より中空糸内部に透過させる請求項15に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

17. 前記中空糸の外壁に接触させる血漿の量 $C_{initial}$ と主として液体成分を透過させて、中空糸の外部に接触させている当該血漿を濃縮し得られるフィブリノーゲン濃縮液の量 C_{end} の比、 $C_{initial}/C_{end}$ 比が2～20の範囲である請求項15または16に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

18. 前記 $C_{initial}/C_{end}$ 比が5～10の範囲である請求項15～17の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

19. 前記中空糸の外壁に接触させる当該患者血漿の量が $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times$

10^{-4}m^3 、接触させる中空糸の外表面積が $0.001\sim 1\text{m}^2$ 、吸引による差圧が $0.001\sim 0.08\text{MPa}$ とする請求項15～18の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

20. 前記フィブリノーゲン活性化物質がトロンビンである請求項1～19の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

21. 前記トロンビンが、フィブリノーゲンと同一人の血液から得られたものである請求項20に記載のフィブリン含有生物学的足場材。

22. 血管内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、脾細胞及び造血幹細胞からなる群から選ばれる細胞の培養のために使用する請求項1～21の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

23. 血管内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、脾細胞及び造血幹細胞からなる群から選ばれる少なくとも一種の細胞を、生物学的足場材無しあるいは精製フィブリノーゲン濃縮物を対照とした時、対照を上回る細胞増殖活性を有する請求項1～22の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材。

24. 請求項1～23の何れかに記載のフィブリン含有生物学的足場材を用いて細胞を培養することを含む細胞培養または組織再生のための方法。

25. 前記細胞が、血管内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、脾細胞及び造血幹細胞からなる群から選ばれる請求項24に記載の方法。

26. 前記細胞が、フィブリノーゲン濃縮物の原料とした血漿を採取した人と同一人に由来する請求項24または25に記載の方法。

27. 細胞増殖・分化刺激物質の存在下で培養を行う請求項24～26の何れかに記載の方法。

28. 前記細胞増殖・分化刺激物質が、血小板から放出される物質である請求項27に記載の方法。

29. 前記血小板から放出される物質が、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、かつ白血球を吸着する第1段フィ

ルターに全血を通し、フィルターからの通過画分を得る工程；

(2) (1) で得られた通過画分を、血小板を吸着し、赤血球を通過させる第2段フィルターに通し、血小板が吸着したフィルターを得る工程；

(3) (2) で得られたフィルターに、血小板活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質の含有液を得る工程；を含む方法によって得られる請求項28に記載の方法。

30. 前記血小板活性化物質が、ATP、ADP、コラーゲン、及びトロンビンから成る群から選ばれる少なくとも1つの物質である請求項29に記載の方法。

31. 前記細胞増殖・分化刺激物質が、白血球から放出される物質である請求項27に記載の方法。

32. 前記白血球から放出される物質が、下記の工程：

(1) 赤血球、血小板、及び血漿を通過させ、白血球を吸着する第1段フィルターに全血を通し、白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化白血球放出物質の含有液を得る工程；を含む請求項31に記載の方法。

33. 前記細胞増殖・分化刺激物質が血小板から放出される物質と白血球から放出される物質の混合物である請求項27に記載の方法。

34. 前記血小板から放出される物質と白血球から放出される物質との混合物が、下記の工程：

(1) 赤血球と血漿を通過させ、血小板と白血球を吸着するフィルターに全血を通し、血小板と白血球が吸着したフィルターを得る工程；

(2) (1) で得られたフィルターに、血小板活性化物質と白血球活性化物質を含む回収液を通し、活性化血小板放出物質と活性化白血球放出物質の含有液を得る工程を

含む方法によって得られることを特徴とする請求項33に記載の方法。

35. 細胞が、人由来の細胞をフィルターに通すことによって得られる請求項24～34の何れかに記載の方法。

36. フィブリノーゲン濃縮物の原料である血漿が、人血液をフィルターに通すことによって得られたものである請求項24～34の何れかに記載の方法。

37. 請求項24～36のいずれかに記載の方法によって得られる足場材に担持された細胞培養物または再生組織。

38. 請求項37に記載の細胞培養物または再生組織を、損傷を受けた組織に塗布または移植片として用いる組織再生促進方法。

39. 請求項1～23の何れかに記載の生物学的足場材と細胞を混合した混合物を、損傷を受けた組織に添加する工程を含む組織再生促進方法。

40. 前記細胞が、血管内皮細胞、線維芽細胞、角化細胞、間葉系幹細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、肝臓細胞、膵細胞及び造血幹細胞からなる群から選ばれる少なくとも一つの細胞である請求項39に記載の組織再生促進方法。

41. フィブリン含有生物学的足場材を得るための濃縮システムであって、以下の手段：

(1) ヒト血漿を血漿成分分画膜によって粗精製する手段；

(2) ヒト血漿を前記膜表面に導入する手段；

(3) 前記膜表面からフィブリノーゲン濃縮物を得る手段；

を含むフィブリノーゲン濃縮システム。

42. 前記血漿成分分画膜のカットオフ値が80,000ダルトン以上300,000ダルトン以下であることを特徴とする請求項41に記載のシステム。

43. 前記血漿成分分画膜のカットオフ値が150,000ダルトン以上400,000ダルトン以下であることを特徴とする請求項41に記載のシステム。

44. 前記血漿成分分画膜が中空糸膜である請求項42又は43に記載の濃縮システム。

45. 前記中空糸膜の素材が、親水化ポリスルホン、EVAL(エチレンービニルアルコール共重合体)、PAN(ポリアクリロニトリル)、CDA(セルロースジアセテート)、CTA(セルローストリアセテート)からなる群から選ばれる何れか一つであることを特徴とする請求項44に記載のシステム。

46. 前記中空糸膜素材が、親水化ポリスルホン、またはEVAL(エチレンービニルアルコール共重合体)である請求項45に記載のシステム。

47. 前記導入手段が、前記分画装置に設けた流通口の一つから中空糸膜の内表面または外膜表面にヒト血漿を導入し、別の流通口から導出させる送液装置

または吸引装置である請求項 4 1 ～ 4 6 の何れかに記載の濃縮システム。

4 8. 前記濃縮物を得る手段が、前記分画装置に設けた流通口の一つに接続される濃縮物貯留手段である請求項 4 1 ～ 4 7 の何れかに記載の濃縮システム。

4 9. 前記粗精製手段が、容器に内蔵された中空糸膜の両端部を、中空内部が容器外部に流通するようにポッティングしてなる血漿成分分画装置である請求項 4 1 ～ 4 8 の何れかに記載の濃縮システム。

5 0. 前記粗精製手段が、容器に内蔵された中空糸膜の一端を中空内部が容器外部に流通するようにポッティングし、他端を封止してなる血漿成分分画装置である請求項 4 1 ～ 4 8 の何れかに記載の濃縮システム。

5 1. 血漿成分分画装置における中空糸の中空部にヒト血漿を流通させ、その際に、中空糸内壁から外壁に主として液体成分を透過させて中空糸の末端よりフィブリノーゲン濃縮液を採取する請求項 4 9 に記載の濃縮システムの運転方法。

5 2. 前記中空部に流入させる単位時間あたりの当該患者血漿の量 B_{in} と、中空糸末端より単位時間あたりに採取するフィブリノーゲン濃縮液の量 B_{out} との比 B_{in}/B_{out} が 2 ～ 2 0 の範囲である請求項 5 1 に記載の濃縮システムの運転方法。

5 3. 前記 B_{in}/B_{out} 比が 5 ～ 1 0 の範囲である請求項 5 2 に記載の濃縮システムの運転方法。

5 4. 血漿成分分画装置における中空糸の外壁にヒト血漿を接触させ、その際に、中空糸外壁から内壁に主として液体成分を透過させて、中空糸の外部に接触させている当該血漿を濃縮し、フィブリノーゲン濃縮液を得る請求項 5 0 に記載の濃縮システムの運転方法。

5 5. 血漿を、中空糸の外壁に接触させ、その際に、中空糸外壁から内壁に主として液体成分を透過させる際、中空糸の中空部を減圧にし、吸引によって該成分を中空糸外部より中空部内に透過させる請求項 5 4 に記載の濃縮システムの運転方法。

5 6. 前記中空糸の外壁に接触させる血漿の量 $C_{initial}$ と主として液体成分を透過させて、中空糸の外部に接触させている当該血漿を濃縮し得られるフィブリノーゲン濃縮液の量 C_{end} の比、 $C_{initial}/C_{end}$ 比が 2 ～ 2 0 の範囲である請求

項 5 5 に記載の濃縮システムの運転方法。

5 7. 前記 Cinitial/Cend 比が 5 ～ 1.0 の範囲である請求項 5 4 に記載の濃縮システムの運転方法。

5 8. 前記中空糸の外壁に接触させる当該患者血漿の量が $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4} \text{ m}^3$ 、接触させる中空糸の外表面積が $0.001 \sim 1 \text{ m}^2$ 、吸引による差圧が $0.001 \sim 0.08 \text{ MPa}$ とする請求項 5 4 ～ 5 7 の何れかに記載の濃縮システムの運転方法。

5 9. 下記の手段：

(1) カットオフ値が 80,000 ダルトン以上 300,000 ダルトン以下の血漿成分分画膜によってヒト血漿を分画して、フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿に分離する手段；

(2) 前記フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿とをそれぞれ回収する手段；

(3) 前記フィブリノーゲン濃縮物からフィブリン糊を製造する手段；

(4) 残りの分画血漿を再利用する手段；

を含むフィブリン含有生物学的足場材を製造するためのシステム。

6 0. 下記の手段：

(1) カットオフ値が 150,000 ダルトン以上 400,000 ダルトン以下の血漿成分分画膜によってヒト血漿を分画して、フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿に分離する手段；

(2) 前記フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿とをそれぞれ回収する手段；

(3) 前記フィブリノーゲン濃縮物からフィブリン糊を製造する手段；

(4) 残りの分画血漿を再利用する手段；

を含むフィブリン含有生物学的足場材を製造するためのシステム。

6 1. 前記ヒト血漿が連続的体外循環によって採取された血漿である請求項 5 9 又は 6 0 に記載のシステム。

6 2. 前記ヒト血漿を採取する手段が、全血から血漿を分離する手段を含む請求項 5 9 から 6 1 の何れかに記載のシステム。

6 3. 前記ヒト血漿を分離する手段が、重力分離、遠心分離あるいは膜分離手段である請求項 5 9 ～ 6 2 の何れかに記載のシステム。

64. フィブリノーゲン濃縮物を得るためのヒト血漿から活性化トロンビン血漿を調製する請求項59～63の何れかに記載のシステム。

65. 前記フィブリノーゲン濃縮物から活性化トロンビン液を得る請求項59～64の何れかに記載のシステム。

66. 血漿成分分画膜によって分画して得た残りの分画血漿を、活性化トロンビン血漿の調製に用いる請求項59～65の何れかに記載のシステム。

67. 血漿成分分画膜によって分画して得た残りの分画血漿を、血漿分離手段によって血漿が分離された血漿分離血液と混合して人体に返還する請求項59～66の何れかに記載のシステム。

68. 前記回収手段が、得られるフィブリノーゲン濃縮物を単独ドナー由来のフィブリノーゲン濃縮血漿として貯蔵する手段を含む請求項59～67の何れかに記載のシステム。

69. 前記フィブリン糊を製造する手段が、フィブリノーゲン濃縮物とフィブリン安定化因子及びフィブリノーゲン活性化因子と混合する手段を含む請求項59～68の何れかに記載のシステム。

70. 下記の工程：

(1) カットオフ値が80,000ダルトン以上300,000ダルトン以下の血漿成分分画膜によってヒト血漿を分画して、フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿に分離する工程；

(2) 前記フィブリノーゲン濃縮物フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿と残りの分画血漿とをそれぞれ回収する工程；

(3) 前記フィブリノーゲン濃縮物フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿からフィブリン糊を製造する工程；

(4) 及び、残りの分画血漿を再利用する工程；
を含むフィブリン含有生物学的足場材の製造方法。

71. 下記の工程：

(1) カットオフ値が150,000ダルトン以上400,000ダルトン以下の血漿成分分画膜によってヒト血漿を分画して、フィブリノーゲン濃縮物と残りの分画血漿に分離する工程；

(2) 前記フィブリノーゲン濃縮物フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿と残りの分画血漿とをそれぞれ回収する工程；

(3) 前記フィブリノーゲン濃縮物フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿からフィブリン糊を製造する工程；

(4) 及び、残りの分画血漿を再利用する工程；

を含むフィブリン含有生物学的足場材の製造方法。

72. 前記ヒト血漿が連続的体外循環において採取される工程を含む請求項70又は71に記載の方法。

73. 前記ヒト血漿を採取する工程が、全血から血漿を分離する工程を含む請求項70～72の何れかに記載の方法。

74. 血漿を分離する工程が、重力分離、遠心分離、あるいは膜分離工程である請求項70～73の何れかに記載の方法。

75. 血漿成分分画膜によって分画して得た残りの分画血漿を、血漿分離手段によって血漿が分離された血漿分離血液と混合して人体に返還する工程を含む請求項70～74の何れかに記載の方法。

76. 前記回収工程が、得られるフィブリノーゲン濃縮物を単独ドナー由来のフィブリノーゲン濃縮血漿として貯蔵する工程を含む請求項70～75の何れかに記載の方法。

77. フィブリン糊を製造する工程が、フィブリノーゲンを多く含む高分子分画血漿とフィブリン安定化因子及びフィブリノーゲン活性化因子と混合する工程を含む請求項70～76の何れかに記載の方法。

図 1

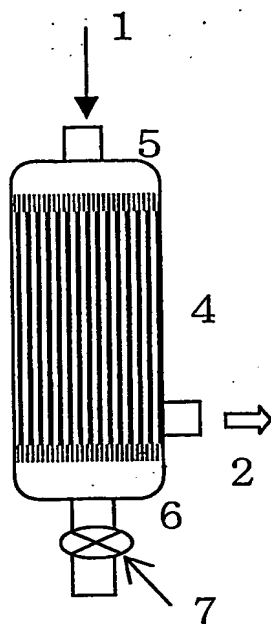


図 2

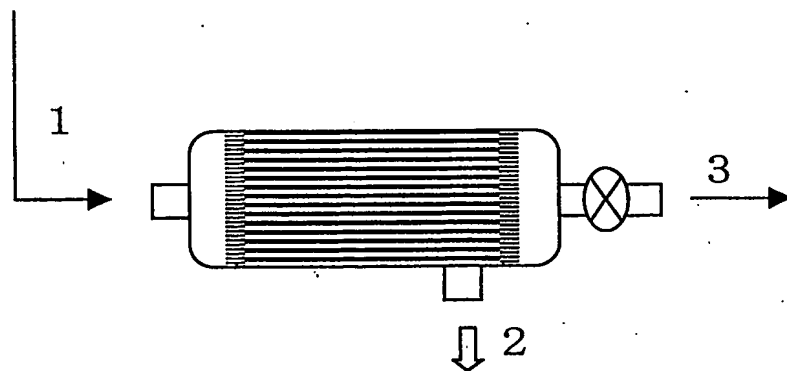


図 3

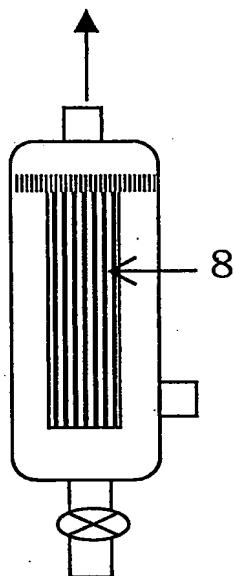


図 4

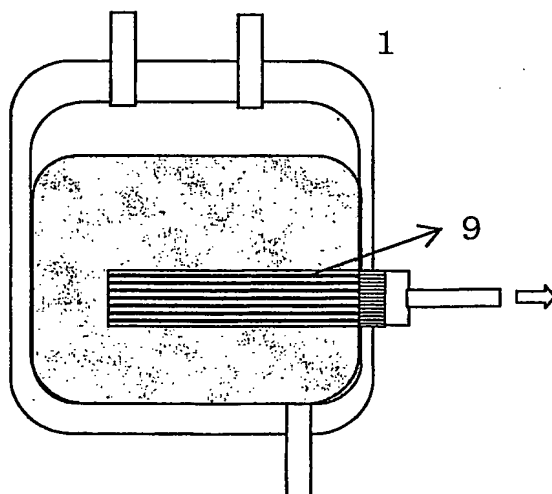


図 5

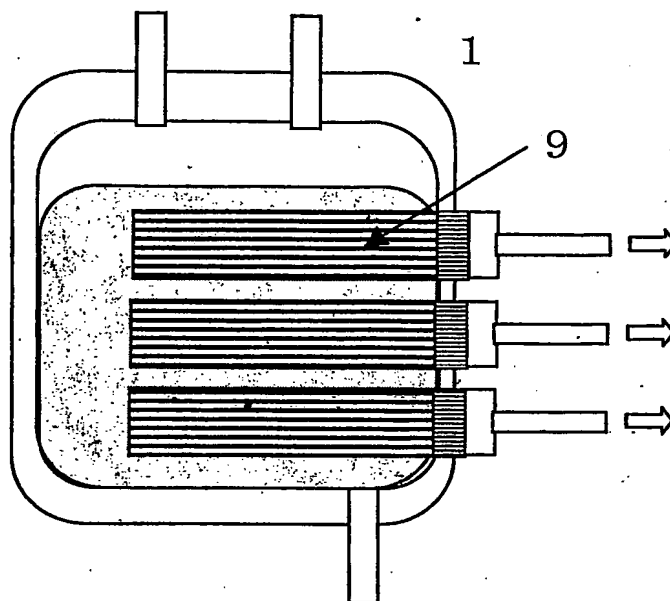


図 6

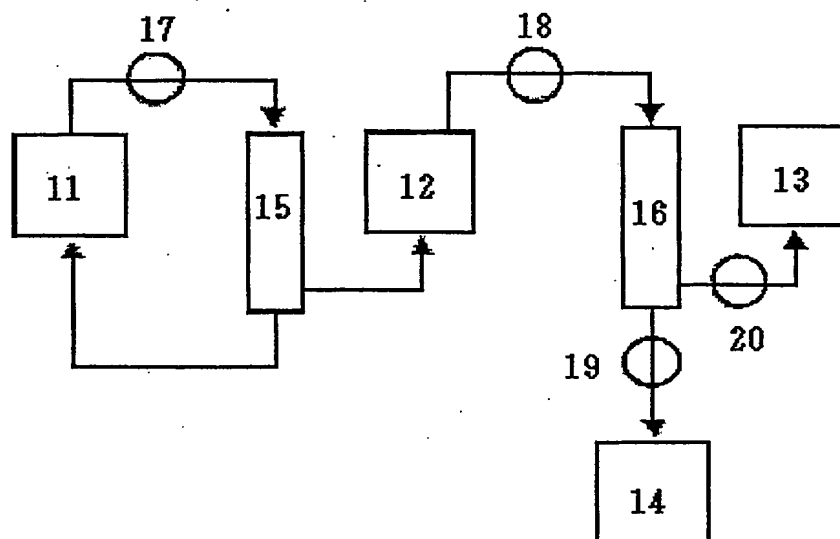


図 7

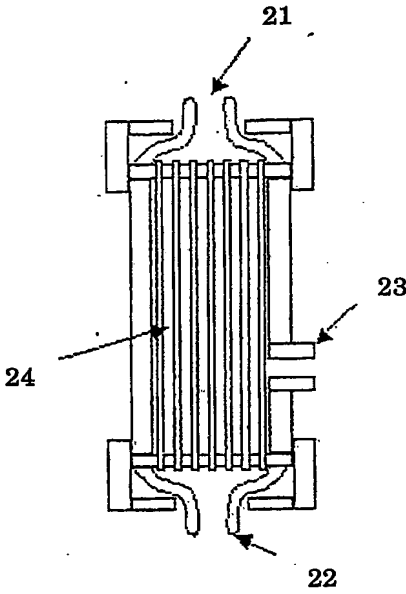
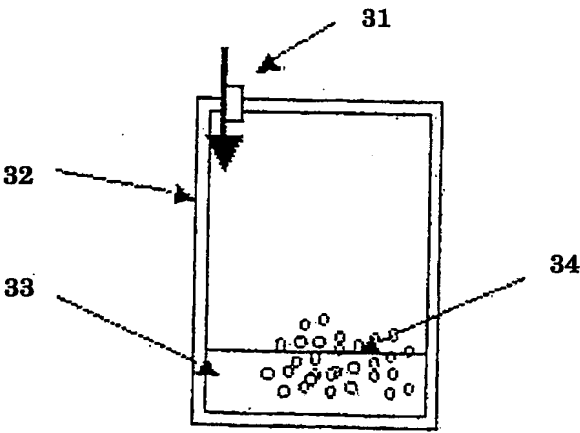


図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12M3/00, A61L27/22, C12N5/06, C12N11/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/14-16, A61L27/00, A61M1/16-18, C12M3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/09018 A1 (FIBROGEN, INC.), 24 February, 2000 (24.02.00), & EP 1105051 A1 & JP 2002-524110 A	1-37, 41-71
Y	WO 97/44135 A1 (THERMOGENESIS CORP.), 27 November, 1997 (27.11.97), & EP 901405 A1 & US 6077447 A1 & JP 2001-513073 A	1-37
Y	JP 6-141844 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 24 May, 1994 (24.05.94), (Family: none)	1-37, 41-71
Y	JP 11-246420 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 14 September, 1999 (14.09.99), (Family: none)	1-37, 63

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
28 November, 2003 (28.11.03)

Date of mailing of the international search report
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10692

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yoshiki TAKAMATSU, "Tensei Fibrinogen Ketsubosho/Ijo Fibrinogen Kessho", separate volume Japanese Journal of Clinical Medicine, Ryoikibetsu Shokogun Series No.21 Ketsueki Shokogun II, Nippon Rinshosha, 30 September, 1998 (30.09.98), page 449	6-19, 41-71
Y	JP 58-206757 A (Asahi Medical Co., Ltd.), 02 December, 1983 (02.12.83), (Family: none)	6-19, 29, 30, 32, 34, 36, 41-71
Y	JP 2002-186667 A (Toyobo Co., Ltd.), 02 July, 2002 (02.07.02), (Family: none)	8, 9, 45, 46
Y	JP 2002-212333 A (Nikkiso Co., Ltd.), 31 July, 2002 (31.07.02), (Family: none)	8, 9, 45, 46
Y	JP 2000-107577 A (Teijin Ltd.), 18 April, 2000 (18.04.00), (Family: none)	8, 45
A	JP 2001-333974 A (Director General of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 04 December, 2001 (04.12.01), (Family: none)	1-37, 41-71

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10692

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 38-40, 72-77

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as claimed in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy or diagnostic methods.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10692

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

• Referential document:

1. International Patent Publication No.513073/2001

According to the statement in the description of the present case, it is recognized that the invention as claimed in claim 1 relates to a fibrin-containing biological scaffold material to be used in the case of employing a fibrin composition for the regeneration of a human tissue and cell proliferation, characterized by containing a mixture of a fibrinogen concentrate, which is obtained from human plasma by a quick and rough purification method, with a fibrinogen activator. Thus, it appears that there is a technical relationship to the inventions as claimed in claims 2 to 40 involving "a special technical feature", i.e., being a fibrin-containing biological scaffold material containing a mixture of a fibrinogen concentrate with a fibrinogen activator.

On the other hand, it is recognized that the inventions as claimed in claims 41 to 77 relate to a system for concentrating fibrinogen from human plasma with the use of a plasma component fractionating membrane to obtain a fibrin-containing biological scaffold material, a method of operating this system and a process for producing a fibrin-containing biological scaffold material by using a concentration system with the use of a plasma component fractionating membrane. However, it cannot be said from the following two reasons that there is any technical relationship involving the same "special technical feature" between the inventions as claimed in claims 1 to 40 and the inventions as claimed in claims 41 to 77. (The term "special technical feature" as used herein means a technical feature that defines a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art. See, if needed, Rule 13.2 of the regulations under the Patent Cooperation Treaty.)

(1) It cannot be recognized that such a fibrin-containing biological scaffold material contains a mixture of a fibrinogen concentrate with a fibrin activator.

(2) Although the inventions as claimed in claims 41 to 77 have a common constitution of concentrating fibrinogen from human plasma, it is described in the document 1 to extract fibrinogen from human plasma.

Such being the case, it is concluded that the present application has 2 groups of inventions, i.e., the inventions as claimed in claims 1 to 40 and the inventions as claimed in claims 41 to 77.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12M3/00, A61L27/22, C12N5/06, C12N11/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/14-16, A61L27/00, A61M1/16-18, C12M3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 00/09018 A1 (FIBROGEN, INC) 2000.02.24 & EP 1105051 A1 & JP 2002-524110 A	1-37, 41-71
Y	WO 97/44135 A1 (THERMOGENESIS CORPORATION) 1997.11.27 & EP 901405 A1 & US 6077447 A1 & JP 2001-513073 A	1-37

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.11.03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4N

3228

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . . . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P 6-141844 A (富士写真フイルム株式会社) 1994. 05. 24 (ファミリーなし)	1-37, 41-71
Y	J P 11-246420 A (積水化学工業株式会社) 1999. 09. 14 (ファミリーなし)	1-37, 63
Y	高松純樹, 先天性フィブリノゲン欠乏症/以上フィブリノゲン血症, 別冊日本臨牀 領域別症候群シリーズNo. 21 血液症候群II、 日本臨床社、1998. 09. 30, p. 449	6-19, 41-71
Y	J P 58-206757 A (旭メディカル株式会社) 1983. 12. 02 (ファミリーなし)	6-19, 29, 30, 32, 34, 36, 41-71
Y	J P 2002-186667 A (東洋紡績株式会社) 2002. 07. 02 (ファミリーなし)	8, 9, 45, 46
Y	J P 2002-212333 A (日機装株式会社) 2002. 07. 31 (ファミリーなし)	8, 9, 45, 46
Y	J P 2000-107577 A (帝人株式会社) 2000. 04. 18 (ファミリーなし)	8, 45
A	J P 2001-333974 A (経済産業省産業技術総合研究所長) 2001. 12. 04 (ファミリーなし)	1-37, 41-71

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 38-40, 72-77 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
上記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置方法又は診断方法に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ) 参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

参照文献：

1. 特表平2001-513073

本願明細書の記載を参酌すると、請求の範囲1に記載された発明は、フィブリン組成物を人体組織の再生及び細胞増殖に用いる場合において、ヒト血漿から、短時間・粗精製工程により得られたフィブリノーゲン濃縮物とフィブリノーゲン活性化物との混合物を含むことを特徴とするフィブリン含有生物学的足場材であると認められ、請求の範囲2-40に記載された発明についても、フィブリノーゲン濃縮物とフィブリノーゲン活性化物との混合物を含むフィブリン含有生物学的足場剤であるという「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係があると認められる。

一方、請求の範囲41-77に記載された発明は、フィブリン含有生物学的足場材を得るために、血漿成分分画膜を用いてヒト血漿からフィブリノーゲンを濃縮するシステム並びに該システムの運転方法、及び、血漿成分分画膜を用いた濃縮システムによりフィブリン含有生物学的足場剤を製造する方法に係るものであると認められるが、

①これらのフィブリン含有生物学的足場剤が、フィブリノーゲン濃縮物とフィブリン活性化物との混合物を含むものとは認められないこと

②請求の範囲1-77に記載された各発明は、いずれもヒト血漿からフィブリノーゲンを濃縮するという共通の構成を含むものであるが、参考文献1には、ヒト血漿からフィブリノーゲンを抽出することが記載されていること

の2つの理由から、請求の範囲1-40に記載された発明と、請求の範囲41-77に記載された発明とが、同一の「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係を有しているものとはいえない。（なお、ここでいう「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として「先行技術」に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである。（要すれば、特許協力条約に基づく規則13.2参照。））

よって、この出願には、請求の範囲1-40に記載された発明と、請求の範囲41-77に記載された発明の、計2の発明が包含されているといえる。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.